
VOLUMEN 26. 1973

ENERO - MARZO. NUMERO 1

Microbiología Española

Revista

*del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y de la Sociedad Española de Microbiología*



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector: Dr. David Vázquez, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Vocales: Dr. Fernando Baquero, Dr. Antonio Portolés, Prof. Agustín Pumarola, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó y Dr. Gonzalo Sierra.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Difusión y Publicaciones, del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Calle de Joaquín Costa, 32 MADRID-6 (España)

Suscripción (4 números): España, 300 PTA; extranjero, 400 PTA

Número: España, 85 PTA; extranjero, 120 PTA

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

“Microbiología Española” publicará fundamentalmente trabajos y notas de investigación, dentro del campo de la Microbiología, y también trabajos doctrinales que se estimen de interés especial. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquiera otra revista. Los que aparezcan en “Microbiología Española” podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, deberán estar escritos a máquina, en papel de tamaño holandesa, por una sola cara, a doble espacio y márgenes de 2 cm a cada lado como mínimo. Los dibujos, con tinta china y en papel vegetal; las cifras, letras y leyendas, a lápiz. Para orientación de los autores, las dimensiones de la caja son 18 × 11,5 cm.

En la cabecera de la primera página se harán constar: Centro en que se ha realizado el trabajo, título (conciso), nombre del autor (o inicial) en letras minúsculas y apellido, en mayúsculas. Al pie de la página deberá figurar la dirección postal del autor.

En líneas generales, los trabajos de investigación constarán de: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Resumen en la otra lengua y Bibliografía. Las notas y trabajos doctrinales se redactarán con arreglo a su naturaleza.

Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. Cuando se adopten abreviaturas no corrientes deberán advertirse en el texto. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Los datos se presentarán en forma de cuadro o de figura; cuadros y figuras, independientemente, estarán numerados y citados en el texto.

El resumen en la otra lengua, de un máximo de doscientas palabras, deberá contener el título del trabajo, un breve esquema del mismo y las conclusiones (abreviadas, en su caso).

La bibliografía se reducirá a la que esté directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabéticas, se ajustarán al siguiente orden:

Revistas: apellido del autor, inicial del nombre, año, título del trabajo, nombre abreviado de la revista (según Chemical Abstracts), número del tomo o volumen y páginas inicial y final.

Libros: apellido del autor e inicial del nombre [en su caso, del recopilador (“editor”)], año, título de la obra, tomo o volumen, capítulo (en su caso), página, editorial y población.

Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en el plazo máximo de diez días para los residentes en España, y en el de veinte, para el extranjero. Transcurridos dichos plazos sin devolución de pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha de envío se anulará. Las modificaciones hechas por el autor que excedan del 2 % del texto serán abonadas por él.

Cada autor tendrá derecho a treinta separatas gratuitas; si deseara más, deberá indicarlo por escrito cuando devuelva las pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

La responsabilidad de los conceptos escritos corresponde a los autores.

Los trabajos se enviarán al Secretario de “Microbiología Española”, Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo Rector de la Revista.

I N D I C E

	Página
Ultraestructura y composición química del antígeno de Boivin (endotoxina), por <i>M. Santaolalla</i> y <i>M.^a Dolores Esplá</i>	1
Efecto del pentaclorofenol sobre la flora microbiana de suelos seleccionados, por <i>R. Vela-Múzquiz</i> y <i>Patricia Kasper</i> ...	21
Inoculación conjunta de microorganismos movilizadores de fósforo y <i>Rhizobium</i> en cultivos enarenados de judía. I. Efectos sobre la parte aérea de las plantas en experiencia hasta floración, por <i>R. Azcón</i> , <i>J. M. Barea</i> y <i>V. Callao</i> (†)	31
Aislamiento de un <i>Vibrio</i> halófilo a partir de aguas residuales de zonas alejadas del mar, por <i>J. M. Arcos</i> , <i>A. del Moral</i> y <i>J. Repáraz</i>	41
Prof. Vicente Callao (†), por <i>J. Olivares</i>	55
Conferencia sobre Colecciones de Cultivos	56
Bibliografía, por <i>F. Ruiz-Falcó</i>	57

C O N T E N T S

	Page
Ultrastructure and chemical composition of the Boivin endotoxin, by <i>M. Santaolalla</i> and <i>M.^a Dolores Esplá</i>	1
Effect of pentachlorophenol on the microbial flora of selected soils, by <i>R. Vela-Múzquiz</i> and <i>Patricia Kasper</i>	21
Inoculation of mobilizing-phosphates microorganisms and <i>Rhizobium</i> in sand-organic matter cultures ("enarenados") of <i>Phaseolus vulgaris</i> . I. Effects on shoots at flowering, by <i>A. Azcón</i> , <i>J. M. Barea</i> and <i>V. Callao</i> (†)	31
Isolation of an halophilic <i>Vibrio</i> from sewage waters proceeding of far-away sea areas, by <i>J. M. Arcos</i> , <i>A. del Moral</i> and <i>J. Repáraz</i>	41
Prof. Vicente Callao (†), by <i>J. Olivares</i>	55
Conference on Culture Collections	56
Bibliography, by <i>F. Ruiz-Falcó</i>	57

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA
SECCION DE VIRUS VEGETALES

ULTRAESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DEL ANTIGENO DE BOIVIN (ENDOTOXINA)

por

M. SANTAOLALLA y M.^a DOLORES ESPLÁ

INTRODUCCION

Anteriormente, hemos estudiado (18-20) la ultraestructura y composición química del lipopolisacárido de *Erwinia carotovora* y de *Agrobacterium tumefaciens*, formas normal y L fija, ambos microorganismos gram-negativos y patógenos de plantas.

El lipopolisacárido es un componente básico de la endotoxina, que como sabemos, es el complejo macromolecular formado por proteína-lípido-lipopolisacárido; tratamos ahora de realizar un estudio comparativo sobre la ultraestructura y composición química de la endotoxina de los tres microorganismos obtenida por el método de Boivin y Mesrobeanu (2-3); y al mismo tiempo descubrir algunas posibles relaciones al compararlas con el lipopolisacárido.

La endotoxina es la causante de los efectos fisiológicos que se producen en los animales de experimentación cuando son inoculados con bacterias muertas por el calor; su parte más conocida es la correspondiente al lipopolisacárido, cuya estructura química puede considerarse casi totalmente esclarecida en algunas especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*. Sin embargo, en cuanto a composición química del lipopolisacárido de microorganismos patógenos de plantas, los estudios sobre estructura química

mica del lipopolisacárido son escasos, y respecto a estructura submicroscópica del lipopolisacárido de estos microorganismos, solamente conocemos los realizados por nosotros. Respecto a la ultraestructura y composición química de la endotoxina de Boivin de microorganismos patógenos de plantas no conocemos ninguno.

MATERIALES Y METODOS

Empleamos una estirpe de *Erwinia carotovora* (b, 312, E. Hellmers 904, 1952, Dinamarca), el *Agrobacterium tumefaciens* estirpe AT de la vid, y su forma L fija obtenida por inducción con glicocola por los Drs. Rubio-Huertos y Beltrá (15).

Cultivamos los microorganismos en caldo común, con agitación a 28°-30 °C, durante 48 h. Separamos las células por centrifugación, lavamos con agua estéril varias veces y liofilizamos.

Extracción de la endotoxina

Seguimos el método de Boivin y Mesrobeanu (2-3). Los microorganismos se suspenden en agua destilada de forma que a 1 cm³ de suspensión corresponda un peso de 200 mg de microorganismos. A la suspensión bacteriana se le adiciona su volumen de una solución acuosa de ácido tricloroacético 0,5 N, se agita enérgicamente la mezcla durante algunos instantes y después se abandona durante 3 h en hielo. Se separan los cuerpos microbianos del líquido tricloroacético por centrifugación a gran velocidad; se decanta el extracto tricloroacético, se filtra a través de un papel de filtro y se centrifuga de nuevo para asegurarnos que no queda ningún residuo.

Se neutraliza con hidróxido sódico hasta pH 7.

Si se formase un pequeño precipitado en la solución neutralizada, se separa por centrifugación o filtración.

Las células así tratadas por el ácido tricloroacético guardan su morfología aparente y su colorabilidad electiva a los métodos de Gram. El líquido de extracción tricloroacética está coloreado de amarillo pálido y según las bacterias utilizadas es límpido o más o menos opalescente. La opalescencia se debe a la presencia del antígeno completo.

Microscopia electrónica

a) *Tinción negativa*. Se hizo por el método general con ácido fosfotúngstico.

b) *Sombreado con oro-paladio*. Empleamos también las rejillas preparadas con carbón y la técnica corriente (20).

Las microfotografías electrónicas fueron hechas con el microscopio Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopia Electrónica, del Centro de Investigaciones Biológicas.

Análisis químico

Determinación del nitrógeno

Usamos el micrométodo de Kjeldahl.

Determinación de carbohidratos totales

Seguimos el método de la antrona de Morris (11) modificado por Trevelyan y Harrison (22).

Con este método determinamos todos los azúcares, tanto libres como combinados, ya que el SO_4H_2 es capaz de hidrolizar los carbohidratos complejos.

Determinación de lípidos

Hidrolizamos la endotoxina con ácido acético al 2 %, a reflujo, durante 1 h. El hidrolizado lo extraemos tres veces consecutivas con cloroformo-metanol (2:1, v), reunimos las capas clorofórmicas y evaporamos el disolvente a baja presión, pesando a continuación el material lipídico hasta peso constante.

Hidrólisis de la endotoxina

1. *Hidrólisis de azúcares*. Empleamos SO_4H_2 2N, a 100 °C, durante 2 h. Neutralizamos con $\text{Ba}(\text{OH})_2$, eliminando el precipitado de SO_4Ba por centrifugación. Este precipitado se lava varias veces con agua destilada, recogiendo conjuntamente las aguas de lavado con el primer líquido obtenido. Esta solución acuosa se concentra a volumen reducido.

2. *Hidrólisis de la proteína*. La efectuamos con ClH 6N, a 115 °C, durante 16 h. Eliminamos el ClH por evaporaciones a presión reducida en un desecador de vacío, en presencia de perlas de NaOH .

Análisis cromatográfico

1. *Cromatografía sobre capa fina.* Para investigar azúcares, empleamos el método de Lato y colaboradores (7), usando como disolvente: butanol-n-acetato de etilo-isopropanol-ácido acético-agua (35:100:60:35:30); como revelador: 20 mg de naftoresorcinol, 10 cm³ de etanol y 0,2 cm³ de SO₄H₂ concentrado.

2. *Cromatografía sobre papel.* Usamos papel whatman núm. 1 y cromatografía descendente.

a) Análisis de monosacáridos. El disolvente empleado es: butanol-n, 40; ácido acético, 10, y agua, hasta saturación. Los reveladores fueron plata alcalina, según Trevelyan y colaboradores (22), y ninhidrina, según Cramer (4).

b) Análisis de aminoácidos. El disolvente usado fue: butanol-n, 40; etanol, 10; ácido acético, 10, y agua, 20. Revelador: ninhidrina al 0,1 % en alcohol isopropílico, o isatina, al 0,2 % en acetona.

RESULTADOS

Microscopia electrónica

Las *figuras 1-2* muestran distintas preparaciones de la endotoxina de la *Erwinia carotovora*, obtenidas por el método del sombreado; en ellas aparecen estructuras en forma de bastoncillos perfectamente definidos, y esferillas. La *figura 3* corresponde a una preparación de la misma endotoxina obtenida por tinción negativa, y en ella se aprecian formas irregulares, cerradas, de contorno curvo, que parecen englobar una sustancia granular.

Las *figuras 4-5* corresponden a preparaciones de la endotoxina del *Agrobacterium tumefaciens*, forma normal, obtenidas por el método del sombreado con oro-paladio; ambas fueron tomadas bajo el mismo aumento. En la *figura 4* aparecen las estructuras en forma de esferitas, y en la *figura 5* se observan formas filamentosas más o menos sinuosas.

Las *figuras 6-7* corresponden a la endotoxina de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens*. La *figura 6*, obtenida por el método de sombreado con oro-paladio, muestra las estructuras típicas de la endotoxina en forma de esferitas y bastoncillos. La *figura 7* representa la misma endotoxina en una preparación obtenida mediante tinción negativa, y en ella aparecen estructuras subredondeadas.

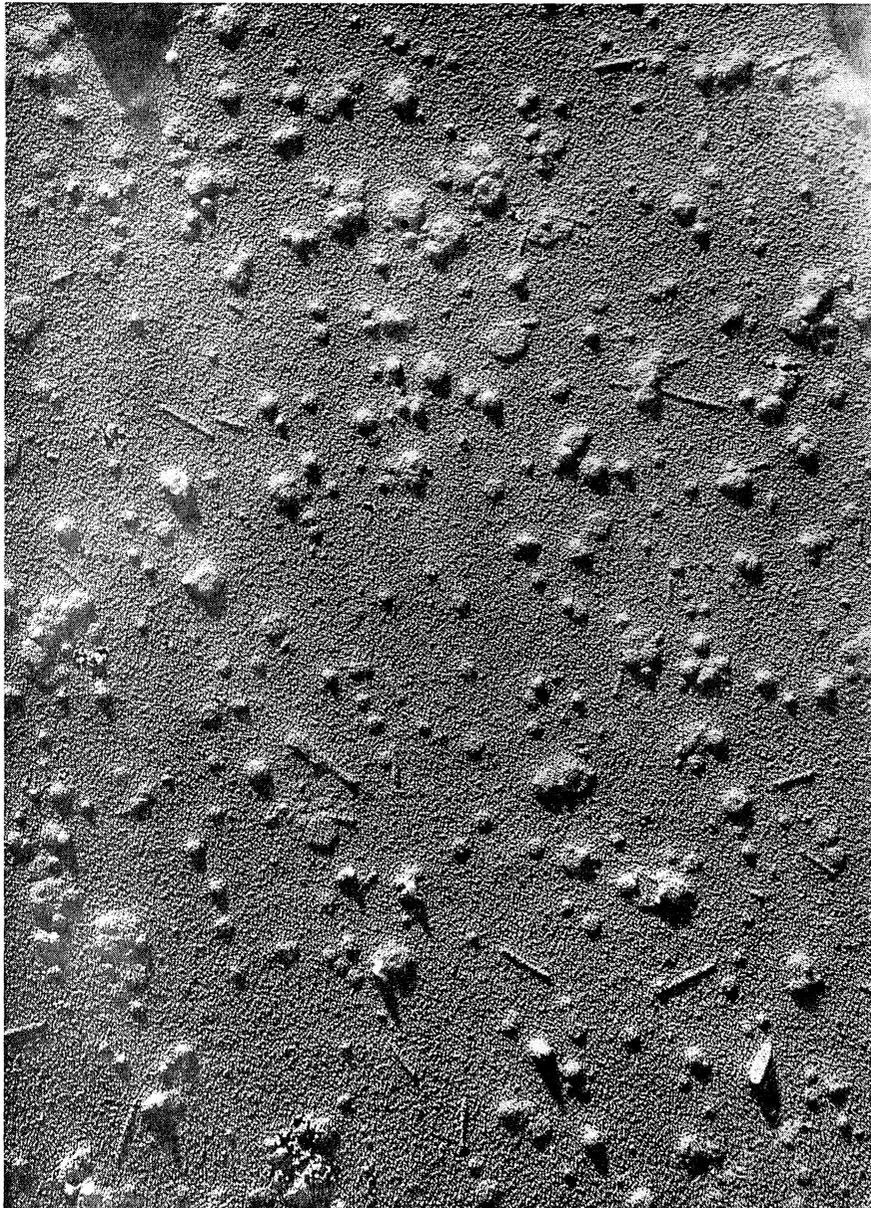


Figura 1. Endotoxina de *E. carotovora*; sombreado con oro-paladio. $\times 40.000$

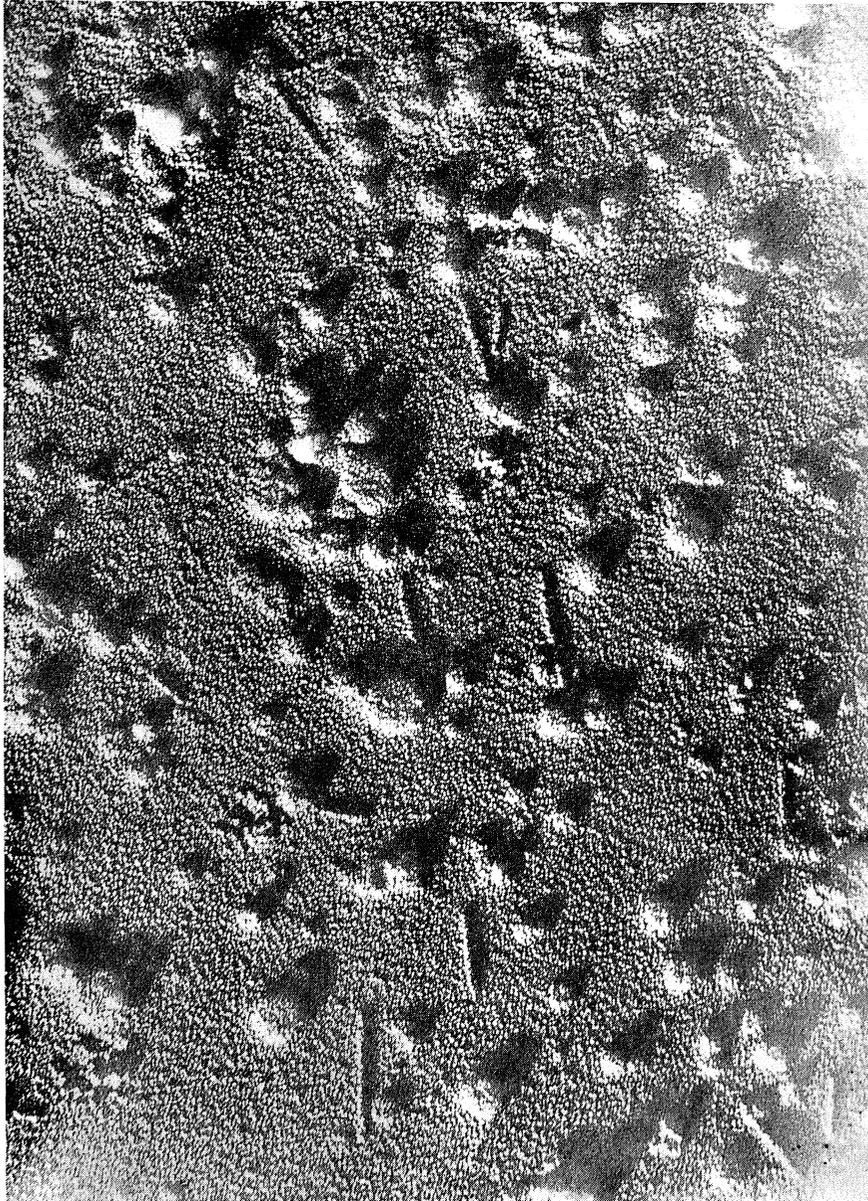


Figura 2. Endotoxina de E. carotovora; sombreado con oro-paladio. X 80.000

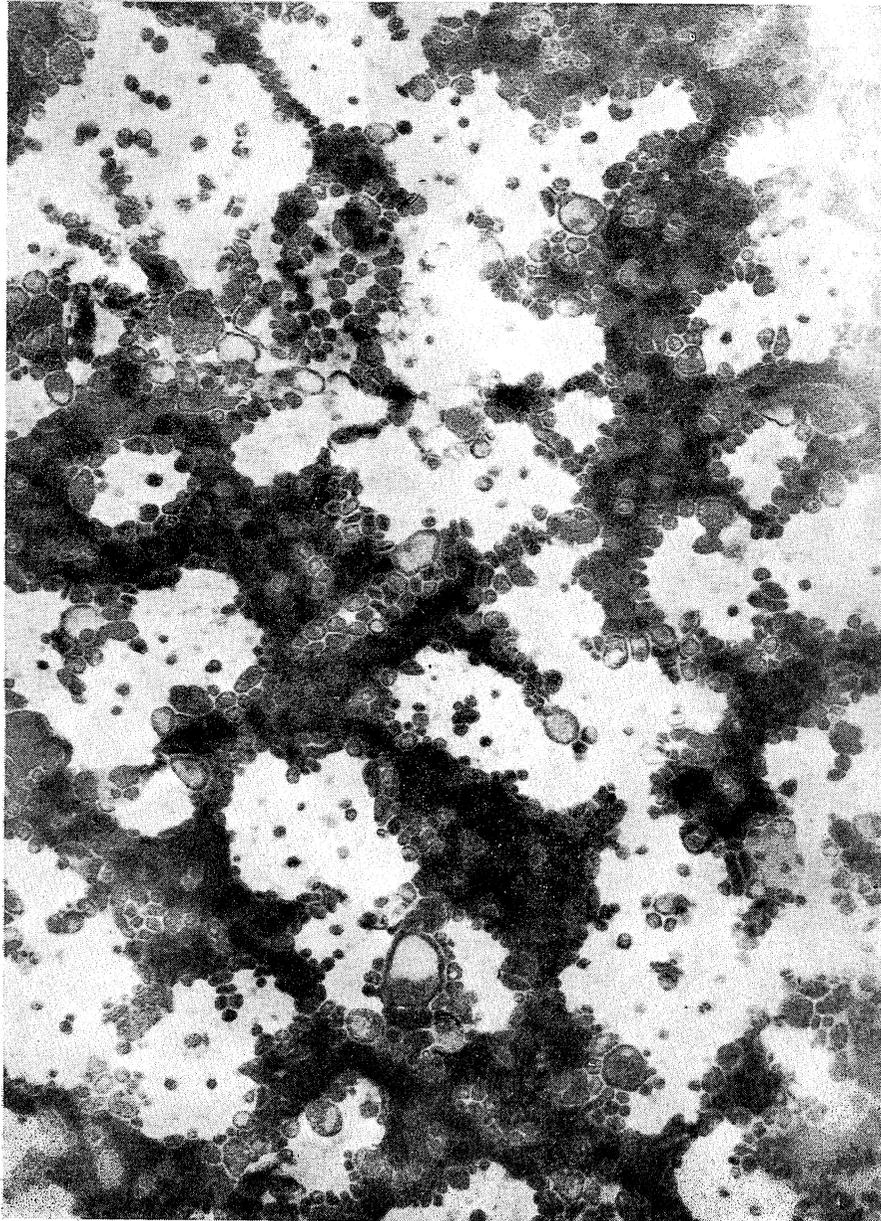


Figura 3. Endotoxina de *E. carotovora*; tinción negativa. $\times 80.000$

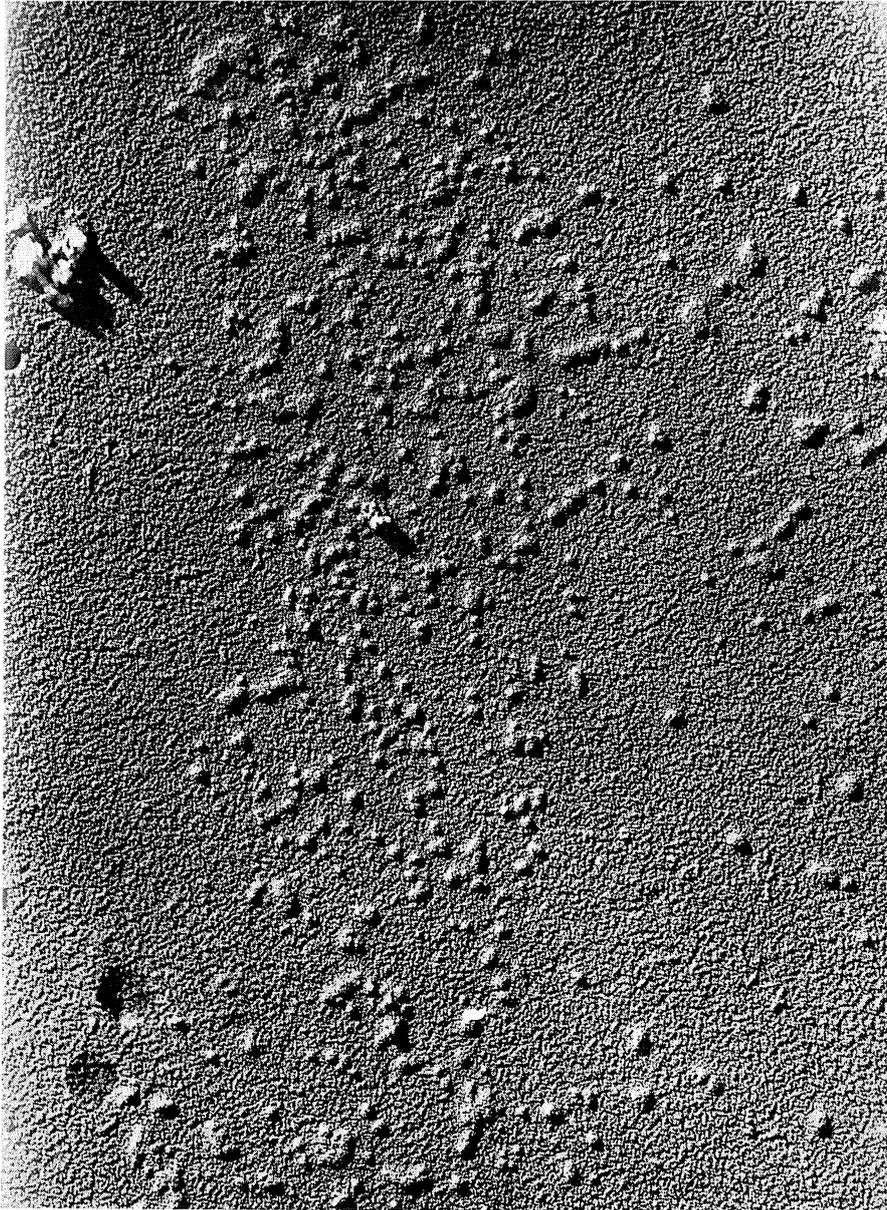


Figura 4. Endotoxina de A. tumefaciens, forma normal; sombreado con oro-paladio. $\times 44.000$



Figura 5. Endotoxina de *A. tumefaciens*, forma normal; sombreado con oro-paladio. $\times 44,000$

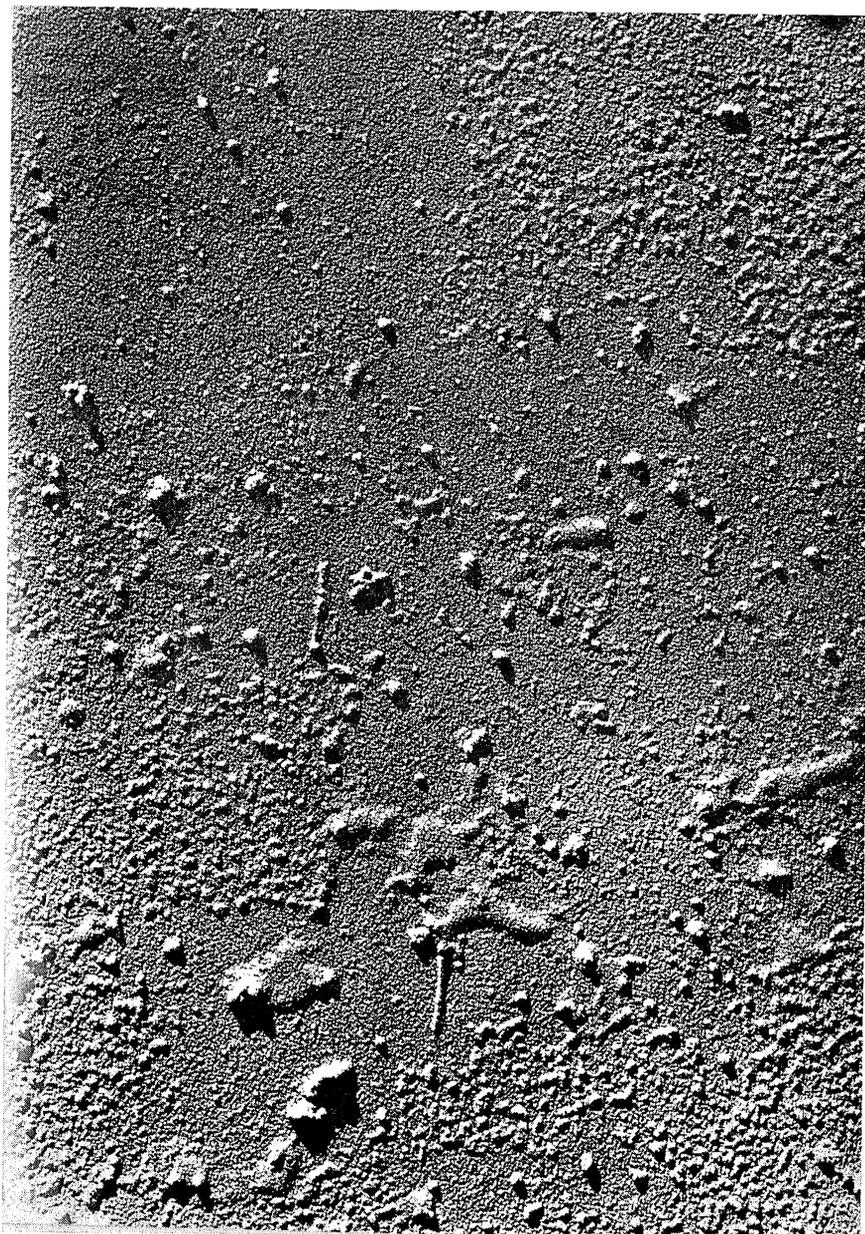


Figura 6. Endotoxina de A. tumefaciens, forma L; sombreado con oro-paladio. $\times 40.000$

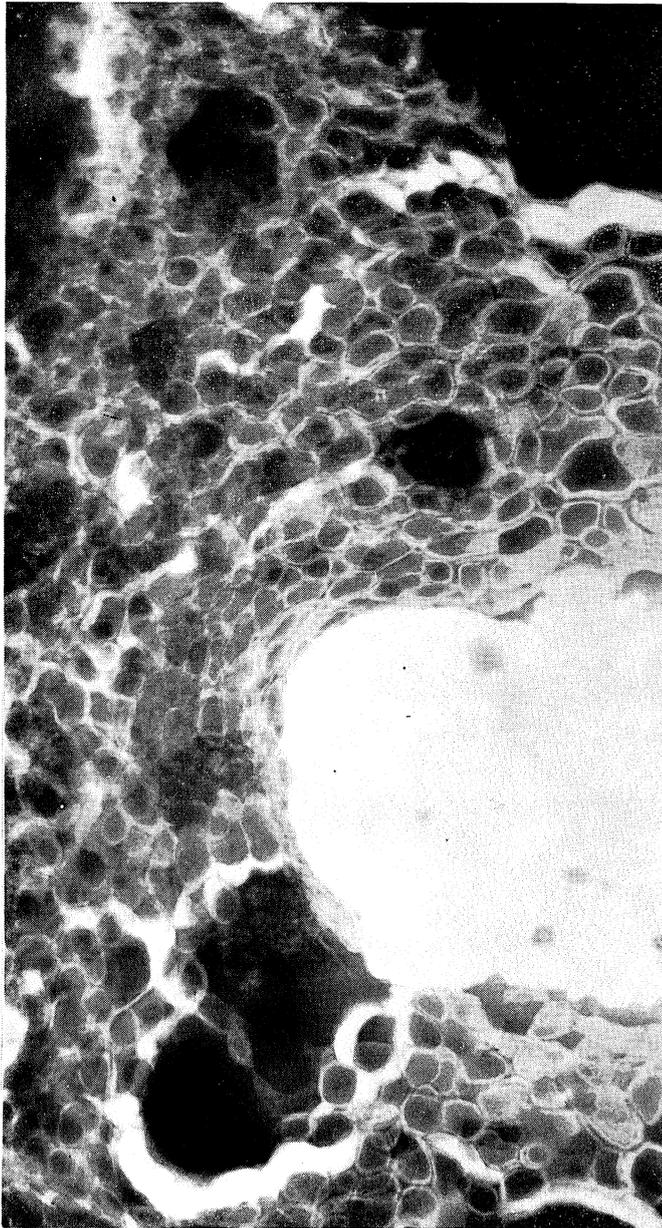


Figura 7. Endotoxina de *A. tumefaciens*, forma L; tinción negativa. $\times 40.000$

Análisis químico

La endotoxina de los tres microorganismos estudiados, obtenida por el método indicado y liofilizada, representa los porcentajes expresados en el cuadro 1.

Cuadro 1

Microorganismo	Células liofilizadas g	Endotoxina obtenida g	Endotoxina %
<i>E. carotovora</i>	1,5	0,060	4,00
<i>A. tumefaciens</i>	4,5	0,157	3,40
<i>A. tumefaciens</i> , forma L	5,7	0,072	1,25

Se aprecia que el porcentaje de la endotoxina de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens* es considerablemente menor.

En el cuadro 2 consignamos los valores de nitrógeno, azúcares totales y monosacáridos identificados de la endotoxina de estos tres microorganismos.

Cuadro 2

Microorganismo	N	Azúcares totales (método de la antrona)	Monosacáridos
<i>E. carotovora</i>	5,1 %	20 %	Galactosamina Galactosa Glucosa Ramnosa Indentificado (a) Glucosamina Galactosa
<i>A. tumefaciens</i>	3,2 %	41,7 %	Glucosa Indentificado (b) Xilosa Fucosa Ramnosa Glucosamina Galactosa
<i>A. tumefaciens</i> , forma L	3,15 %	40,3 %	Glucosa Xilosa Fucosa Ramnosa

a) Rf respecto a la glucosa, 2,06; b) idem, 1,19.

En la hidrólisis de la proteína contenida en la endotoxina de estos microorganismos, encontramos los aminoácidos indicados en el *cuadro 3*, donde el número de cruces está en relación con la proporción en que se encuentran; los puntos indican la mínima cantidad (indicios).

La treonina no aparece en la endotoxina de la *Erwinia carotovora*; el resto de los aminoácidos que indicamos se encuentran en ambas endotoxinas, donde solamente se aprecian diferencias cuantitativas.

Cuadro 3

Aminoácido	<i>E. carotovora</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Forma L del <i>A. tumefaciens</i>
Acido diaminopimélico	+	•	+
Ornitina	++	•	++
Lisina	++	+	+
Arginina	++	++	+
Acido aspártico	++	++	++
Glicina	+++	+++	+++
Acido glutámico	++	++	++
Treonina	—	•	+
Alanina	++	++	++
Prolina	+	++	++
Tirosina	+	+	+
Valina	++	+	++
Fenil-alanina	+	+	+
Leucina	++	+	++

Los porcentajes de lípidos obtenidos de las endotoxinas después de una hidrólisis ácida suave, como indicamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, se indican en el *cuadro 4*.

Cuadro 4

Microorganismos	Lípidos %
<i>E. carotovora</i>	17,2
<i>A. tumefaciens</i>	14,4
<i>A. tumefaciens</i> , forma L	31,6

DISCUSION

En cuanto a la estructura submicroscópica de la endotoxina extraída de los tres microorganismos estudiados en el presente trabajo, los resultados encontrados son bastante similares.

Las endotoxinas de la *Erwinia carotovora* y de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens* aparecen al ser observadas al microscopio electrónico en preparaciones sombreadas con oro-paladio en forma de bastoncillos y esferillas (formas esféricas mezcladas con otras en forma de barras más o menos largas); los bastoncillos tal vez estén formados por una orientación lineal de los cuerpos esféricos.

En la endotoxina de la forma bacilar del *Agrobacterium tumefaciens*, las estructuras en forma de barras rectilíneas no fueron encontradas, aunque sí unas partículas alargadas con forma más o menos sinuosa mezcladas con las estructuras en formas esféricas (véanse figuras).

En el año 1966, Beer y colaboradores (1), estudiando con el microscopio electrónico la estructura de la endotoxina de *Escherichia coli* O: 113, obtenida por el método de Boivin, demuestran que está compuesta principalmente de dos clases de partículas de distinto tamaño, a cada una de las cuales corresponde distinta actividad biológica; el componente de bajo peso molecular virtualmente no era tóxico, mientras que el de alto peso molecular presentaba gran toxicidad.

También Marsh y Walker (8), en el mismo año, estudian la estructura submicroscópica de la endotoxina libre de *Escherichia coli* O 78K 80. Los autores aislan del fluido supernadante del cultivo del microorganismo distintas fracciones que examinan por medio de tinción negativa con ácido fosfotúngstico; la que denominaron "endotoxina libre" contenía gran cantidad de partículas en forma de bastoncillos iguales, que fueron considerados como la endotoxina nativa, no degradada, y formada por el complejo proteína-lipopolisacárido; la extracción con fenol-agua de estas partículas o del total de los microorganismos, daba origen, según los autores, a la agregación del complejo, dando lugar a la interlineación del mismo, por lo que aparece en forma de cadenas iguales. Estas mismas formas de bastoncillos y cadenas fueron también observadas en preparaciones de endotoxina obtenidas por extracción de los microorganismos con éter acuoso.

También Rogers y colaboradores (14) estudian por microscopía electrónica un complejo proteína-lipopolisacárido extraído de las paredes de

Pseudomonas aeruginosa, y encuentran que está formado de esferillas y bastoncillos, e indican que éstos son originados por las esferillas colocadas en posición lineal.

Estas estructuras submicroscópicas, encontradas por los investigadores mencionados en las endotoxinas de microorganismos gram-negativos y patógenos del hombre y animales superiores, son semejantes a la encontrada por nosotros en los tres microorganismos estudiados gram-negativos y patógenos de plantas.

Respecto a los porcentajes de endotoxina extraída de los tres microorganismos, la mayor proporción, un 4 % referido a peso seco, corresponde a *Erwinia carotovora*; un 3,4 % a la forma normal de *Agrobacterium tumefaciens* y un 1,25 % a la forma L fija de *A. tumefaciens*. Este menor porcentaje de endotoxina hallado en la forma L fija de *A. tumefaciens*, forma L estable, que como sabemos da origen a tumores en las plantas, no diferenciables estructuralmente de aquellos originados por la forma normal, pudiera estar relacionado con el mayor tiempo que necesita este microorganismo para producir los tumores, y también con el menor tamaño que presentan éstos, según los trabajos de Tejerina y colaboradores (21).

Kaijser y colaboradores (5) demostraron por diversas técnicas de inmunodifusión, inmunolectroforesis y hemaglutinación pasiva, que las formas L de *Escherichia coli*, obtenidas por inducción con penicilina, contenían, por lo menos, cuatro antígenos comunes con la forma normal, y también poseían antígeno 0; aunque todos en menor proporción que la forma normal de que procedían. Minck y Kirn (10) señalaron que las formas L de *Proteus* P 18, actuaban como antígenos más débiles que las formas normales.

Observando el cuadro 2, vemos que los porcentajes de nitrógeno de las endotoxinas de ambas formas de *Agrobacterium tumefaciens* son prácticamente iguales, 3,2 y 3,15 %, respectivamente, para las endotoxinas de la forma normal y L. La endotoxina de *Erwinia carotovora* contiene mayor proporción de nitrógeno, un 5,1 %; este resultado concuerda con su menor proporción de azúcares totales determinados por el método de la antrona, que en esta endotoxina correspondió al 20 %, mientras que en los otros dos microorganismos con menor porcentaje de nitrógeno, los valores de azúcares totales encontrados por el mismo método fueron 41,7 y 40,3 % (cuadro 2).

En cuanto a monosacáridos identificados después de la hidrólisis ácida, encontramos en la endotoxina de *Erwinia carotovora* galactosamina, galactosa, glucosa y ramnosa, y un monosacárido no identificado con un Rfg de 2,06. En la endotoxina de ambas formas de *Agrobacterium tumefaciens* encontramos glucosamina, galactosa, glucosa, xilosa, fucosa y ramnosa; además, en la forma normal de *A. tumefaciens* aparece una mancha con un Rfg de 1,19 no identificada. Estos resultados coinciden sensiblemente con los obtenidos por uno de nosotros (18-19) en estudios sobre el lipopolisacárido de la forma normal y L fija de *A. tumefaciens*.

Entre los aminoácidos encontrados en la parte proteica de la endotoxina, en los tres microorganismos encontramos mayor proporción de glicina, ácido aspártico, ácido glutámico y alanina, resultados concordantes con los encontrados por Rogers (13) en el año 1971 estudiando el complejo proteína-lipopolisacárido de *Escherichia coli* A. Nosotros encontramos también entre los aminoácidos el ácido diaminopimélico, que como sabemos es típico de la pared celular de estos microorganismos, aunque en la forma normal de *Agrobacterium tumefaciens* sólo pudimos caracterizar indicios (cuadro 3).

Wober y Alaupovic (24), en el año 1971, estudiaron la parte proteica de la endotoxina de *Serratia marcescens* y *Escherichia coli* y encontraron en ellas ciertas propiedades inmunológicas similares por poseer un antígeno común determinante.

Los porcentajes de lípidos totales de ambos microorganismos (cuadro 4), coinciden con los hallados anteriormente por uno de nosotros (16-17); el mayor contenido que encontramos en la forma L se debe, como ya señalamos, a que inicialmente, empleando el método clásico de extracción con cloroformo-metanol (2:1), se extrae una lipoproteína compleja; idénticos resultados han obtenido otros investigadores (6 y 12).

RESUMEN

Estudiamos la estructura submicroscópica de la endotoxina extraída por el método de Boivin de *Erwinia carotovora* y formas normal y L fija de *Agrobacterium tumefaciens*. La correspondiente a *E. carotovora* aparece en forma de barras y esferas, semejante a la encontrada en la forma L fija de *A. tumefaciens*. La estructura de la endotoxina de *A. tumefa-*

ciens, forma normal, la observamos en forma de esferas y filamentos más o menos sinuosos.

También estudiamos la composición química de las tres endotoxinas. Señalamos el menor porcentaje de endotoxina obtenido de la forma L de *Agrobacterium tumefaciens*, menos de la mitad que el de la forma normal. Las diferencias de estas dos endotoxinas en cuanto a azúcares y aminoácidos son principalmente cuantitativas, pero en cuanto a contenido en lípidos éstas son más significativas. La composición química de la endotoxina de *Erwinia carotovora* se compara con estas otras.

SUMMARY

Ultrastructure and chemical composition of the Boivin endotoxin

Endotoxins from *Erwinia carotovora* and normal *Agrobacterium tumefaciens* and fixed L form of *A. tumefaciens* were obtained by the Boivin method. Observations of these endotoxins on the electron microscope by negative staining and shadow-casting showed that the endotoxin of *E. carotovora* and L form of *A. tumefaciens* were morphologically alike they are forming short straight rods and spherical bodies, whereas the endotoxin from the normal form of *A. tumefaciens* consisted of spherical bodies and flexuous longer filaments.

The percentage of endotoxin obtained from the L form was 1.25 %, the normal form was 3.4 and *Erwinia carotovora* 4 %.

Chemical analysis of the three endotoxins showed quantitative and qualitative differences in sugars, amino acids and lipids.

BIBLIOGRAFIA

1. BEER, H.; BRUDE, A. J., and BRINTON (jr.), C. C. 1966. A study of particle size, shapes and toxicities in a Boivin-type endotoxic preparation. Ann. N. Y. Acad. Sci., 133, 450-75.
2. BOIVIN, A., et MESROBEANU, L. 1935. Recherche sur les antigenes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. I. Considerations générales et exposé des techniques utilisées. Rev. Immunol., 1, 533-69.
3. BOIVIN, A.; MESROBEANU, I., et MESROBEANU, L. 1933. Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens spécifiques. C. R. Soc. Biol., 133, 490-92.

4. CRAMER, F. 1958. Cromatografía sobre Papel. 3.^a ed. Editorial Beta, Buenos Aires.
5. KAUSER, B.; BRONSON, J. E.; HANSON, L. A., and SEEBERG, S. 1971. Immunological studies on the L form of an *E. coli* strain. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B., 79, 719-20.
6. KOTELKO, K.; LUDERITZ, O., und WETPHAL, O. 1965. Vergleichende Untersuchungen an antigenen von *Proteus mirabilis* und einer stabilen L-form. Biochem. Z., 343, 227-42.
7. LATO, M.; BRUNELLI, B.; CIUFFINI, G., and MEZZETTI, T. 1968. Analysis of carbohydrates in biological fluids by means of thin layer chromatography. J. Chromatog. 36, 191-97.
8. MARSH, D. G., and WALKER, P. D. 1968. Free endotoxin and non-toxic material from Gram-negative bacteria: Electron microscopy of fractions from *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 52, 125-30.
9. MILNER, K. C.; ANACKER, R. L.; FUKUSHI, K.; HASKINS, W. T.; LANDY, M.; MALMGREN, B., and RIBI, E. 1963. Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties. III. Structure and biological properties of surface antigens from Gram-negative bacteria. Bacteriol. Rev., 27, 352-68.
10. MINCK, R., and KIRN, A. 1960. Pleuropneumonia-like organisms and L forms of bacteria. Ann. N. Y. Acad. Sci., 79, 658-61.
11. MORRIS, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's antrone reagent. Science, 107, 254.
12. NESBITT, J. A., and LENNARZ, W. J. 1965. Comparison of lipids and lipopolysaccharide from the bacillary and L forms of *Proteus* P 18. J. Bacteriol., 89, 1020-25.
13. ROGERS, D. 1971. Release of a lipopolysaccharide-protein complex from *Escherichia coli* A by warm-water treatment. Biochim. Biophys. Acta, 230, 72-81.
14. ROGERS, S. W.; GILLELAND (jr.), H. E., and EAGON, R. E. 1968. Characterization of a protein-LPS complex released from cell walls *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediaminetetraacetic acid. Can. J. Microbiol., 15, 743-48.
15. RUBIO-HUERTOS, M., and BELTRA, R. 1962. Fixed pathogenic L form of *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, 195, 4836.
16. SANTAOLALLA, M. 1965. Estudio comparativo del componente graso del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. I. Aislamiento de las distintas fracciones lipídicas. Microbiol. Españ., 18, 13-21.
17. SANTAOLALLA, M. 1966. Estudio comparativo del componente graso del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. II. Variaciones según el medio de cultivo y estudio de los fosfolípidos. Microbiol. Españ., 19, 1-10.
18. SANTAOLALLA, M. 1971. Estructura y composición química del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*. Microbiol. Españ., 24, 243-56.
19. SANTAOLALLA, M. 1972. Estructura y composición química del lipopolisacárido de la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens*. Microbiol. Españ., 25, 179-94.

20. SANTAOLALLA, M., y ESPLA, D. 1972. Electron microscopy of lipopolysaccharide from *Erwinia carotovora* and the bacillary and L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 25, 91-104.
21. TEJERINA, G.; CABEZAS DE HERRERA, E., y RUBIO-HUERTOS, M. 1970. Estudio serológico y patogénico del *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L fijas. *An. Edafol. Agrobiol.*, 29, 99-105.
22. TREVELYAN, W. E., and HARRISON, J. S. 1952. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.*, 50, 298-303.
23. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P., and HARRISON, J. S. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166, 444-45.
24. WOBBER, W., and ALAUPOVIC, P. 1971. Studies on the protein moiety of endotoxin from Gram-negative bacteria. Characterization of the protein moiety isolated by phenol treatment of endotoxin from *Serratia marcescens* 08 and *Escherichia coli* 0 141: K85 (B). *Eur. J. Biochem.*, 19, 340-56.

NORTH TEXAS STATE UNIVERSITY (USA)
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES

EFFECTO DEL PENTAFLOROFENOL SOBRE LA FLORA MICROBIANA DE SUELOS SELECCIONADOS

por

R. VELA-MÚZQUIZ y PATRICIA KASPER

INTRODUCCION

Entre las sustancias químicas más empleadas en la conservación de materiales putrescibles, el pentaclorofenol es la más frecuentemente utilizada. Su toxicidad contra bacterias, hongos, algas, moluscos, hierbas, etc., hace de ella el conservador predilecto de muchos productos de consumo. Se usa, en combinación con creosota, como un conservador de larga duración (5).

Se han descrito numerosos casos de intoxicaciones en el hombre y está bien demostrado que el pentaclorofenol y su compuesto sódico afectan al hombre cuando son introducidos en el tubo digestivo, absorbidos por la piel o inhalados (10). También se han demostrado casos de mortandad debidos a contaminación del agua con el pentaclorofenol o su derivado sódico (1); si bien Viniegra y colaboradores (13) subrayan que la literatura no indica plenamente la gravedad de las intoxicaciones debidas al pentaclorofenol. Weinbach (14) atribuye la toxicidad universal del pentaclorofenol al hecho de que impide la fosforilación oxidante, bloqueando la transformación del ADP en ATP. Análogos resultados fueron obtenidos por Fujita y colaboradores (3), quienes, además, observaron que un exceso de fósforo inorgánico disminuye el efecto del pentaclorofenol sobre el *Micrococcus lysodeikticus*.

En los Estados Unidos de América del Norte el pentaclorofenol se ha empleado desde el año 1900 en cantidades de cientos de toneladas anuales. Su uso para proteger materiales por períodos prolongados indica que este compuesto no se destruye fácilmente en la naturaleza, presentando un serio problema para el investigador dedicado al estudio de la "ecología bioquímica". Ante esto nos preguntamos: ¿cuál es el mecanismo de eliminación de estas grandes cantidades de pentaclorofenol añadidas a los suelos y a las aguas durante estos 73 años?

Se inició esta investigación con el fin de encontrar microorganismos telúricos que fuesen capaces de transformar el pentaclorofenol en una forma más simple y menos tóxica. Los resultados fueron negativos en este sentido. Durante este trabajo se pudieron aislar dos especies de bacterias con capacidad de resistir a elevadas concentraciones de pentaclorofenato sódico, hecho que no ha sido descrito hasta ahora.

MATERIALES Y METODOS

a) Suelos

Se examinaron 50 muestras de suelos diferentes expuestos a creosota donde se suponía que pudiese haber microorganismos resistentes al pentaclorofenol. Se obtuvieron 9 de estas muestras de una planta industrial preparadora de postes utilizados en las líneas eléctricas y telefónicas, 10 de suelos adyacentes a las vías del ferrocarril, y 31 de suelos adyacentes a los postes antes citados en su emplazamiento definitivo.

Todos los suelos empleados dieron recuentos de bacterias mayores de 10^5 /g de suelo húmedo.

Las muestras fueron obtenidas y preparadas según técnicas ya descritas (11-12).

b) Cultivos

1) Medios de cultivo

Medio sintético: expresado en g/l; NH_4NO_3 , 2,0; Na_2HPO_4 , 0,21; K_2HPO_4 , 0,21; KH_2PO_4 , 0,09; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; KCl , 0,04; CaCl_2 , 0,015; $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,005, y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001, a pH 7,5. Se empleó en forma líquida o con 20 g/l de agar (Difco) en placas de Petri. A este medio se le añadió pentaclorofenol o pentaclorofenato sódico como fuente

de carbono; como cultivo testigo se empleó glucosa (10 g/l) en lugar del pentaclorofenol.

2) *Cultivos anaerobios*

a) Aproximadamente 0,5 g de cada muestra de suelo se colocaron en frascos con tapón de vidrio de 32 ml. A éstos se les añadió suficiente medio sintético líquido saturado con pentaclorofenol (8 mg/l) para asegurarse que al tapar no queda aire en el frasco.

b) De la misma manera se preparó otra serie de cultivos en los que se utilizó el pentaclorofenato sódico (50 mg/l) en lugar de pentaclorofenol.

Estos se incubaron a temperatura ambiente (22°-26 °C) en cámara oscura para evitar la fotodescomposición del pentaclorofenol, así como de su compuesto de sodio (6).

3) *Cultivos aerobios*

De forma similar se inocularon las muestras de suelos en 32 ml de los medios descritos anteriormente en matraces de 250 ml, para dar lugar a amplia aireación. Se incubaron bajo las mismas condiciones que los cultivos anaerobios.

4) *Resistencia al pentaclorofenol*

Dos medios nutritivos completos se formularon para estudiar la resistencia de la flora microbiana de los suelos al pentaclorofenato. Uno de éstos se preparó añadiendo 5 g de extracto de levadura (Difco) y 5 g de glucosa a 1 l del medio sintético. El segundo medio se preparó con 8 g de caldo nutritivo en polvo (Difco) y 5 g de glucosa/l de medio sintético. A ambos medios se les agregó el pentaclorofenato sódico hasta dar una concentración de 50 mg/l y se inocularon con las muestras de los 50 suelos.

c) *Criterio de crecimiento*

Los 200 cultivos en los que el pentaclorofenol o su derivado sódico se usaron como fuentes de carbono, se examinaron diariamente durante 30 días. El crecimiento se apreció por la aparición de turbidez en los cultivos de enriquecimiento primario y se comprobó por observación microscópica y resiembra en medio fresco.

d) Criterio de resistencia

La resistencia de las especies aisladas en cultivo puro al pentaclorofenato fue medida por turbidimetría en un klett-summerson y por recuento de gérmenes en placas de Petri, usando el medio en el que se aisló el organismo, pero sin pentaclorofenol.

e) Identificación provisional de las especies aisladas

Se usaron para esta identificación las técnicas y criterios ya establecidos (2, 9 y 11-12).

f) Valoración del pentaclorofenol

El pentaclorofenato de sodio se valoró siguiendo la técnica de Haskins (4).

RESULTADOS

1. De los 50 cultivos anaerobios en los que el pentaclorofenol era empleado como fuente de carbono, sólo 5 dieron señales de crecimiento, mientras que empleando pentaclorofenato, 12 de ellos dieron crecimiento primario. Un examen microscópico mostró en todos un crecimiento muy escaso y en ningún caso se pudo observar crecimiento en las resiembras de éstos. En todos los testigos conteniendo glucosa en lugar del inhibidor se obtuvo abundante crecimiento.

2. De los 50 cultivos aerobios en que el pentaclorofenol se usó como fuente de carbono, 5 dieron indicación de crecimiento. De éstos se obtuvieron cultivos secundarios, pero al intentar obtener subcultivos a partir de éstos, los resultados fueron negativos. Cuando se utilizó el pentaclorofenato en la misma clase de experimentos se obtuvo un crecimiento abundante en 12 cultivos, pero al resembrarlos ninguno resultó positivo. Todos los testigos crecieron abundantemente.

3. En los experimentos en que se cultivaron los 50 suelos en los medios con extracto de levadura y caldo nutritivo con 50 mg/l de pentaclorofenato, se aislaron 17 cepas bacterianas. El aislamiento se hizo de manera clásica; por ejemplo, el crecimiento del cultivo primario se resembró en medio fresco y esto se repitió 3-4 veces, terminándose el aislamiento en placas de Petri; 7 de las cepas aisladas parecen ser de la

misma especie, aunque los suelos fueron de diferente origen. En las otras 5 se pudieron demostrar 2 cepas diferentes de bacterias en cada cultivo, 5 fueron idénticas a las ya mencionadas, y las otras, de género diferente. Estas también se pudieron resembrar en placas de agar común sin pentaclorofenol, siendo los resultados iguales.

4. Del crecimiento obtenido en los 17 cultivos sólo se pudieron aislar 2 especies diferentes. Una de ellas forma colonias amarillas en agar común, y la otra, colonias blancas. De los 17 cultivos, 9 fueron de cepas de colonias amarillas y 8 de colonias blancas. Estas se clasificaron provisionalmente en los géneros *Flavobacterium* y *Enterobacter*, respectivamente, y se designaron como cepas idénticas con respecto a sus características fisiológicas.

5. Los resultados presentados en el *cuadro 1* muestran la capacidad de las 2 especies aisladas de crecer en presencia de pentaclorofenato sódico. Aunque éstos varían ligeramente en cada experimento, en todos los casos en el medio de cultivo con extracto de levadura se obtuvo mejor crecimiento que en el que contiene caldo común.

Cuadro 1. Límite de resistencia en medios que contienen pentaclorofenato sódico

Concentración en mg/l	Unidades de turbidez klett-summerson a las 72 h de incubación			
	<i>Flavobacterium</i>		<i>Enterobacter</i>	
	Caldo nutritivo	Medio suplementado con extracto de levadura	Caldo nutritivo	Medio suplementado con extracto de levadura
0	56	55	32	100
40	22	44	20	38
80	23	38	22	42
120	20	39	18	44
160	22	43	24	70
180	0	16	0	34
200	0	0	0	0

6. Las figuras 1-2 muestran el efecto de varias concentraciones de pentaclorofenato sobre el crecimiento de estas 2 especies. Es obvio que este compuesto afecta al crecimiento según la concentración empleada.

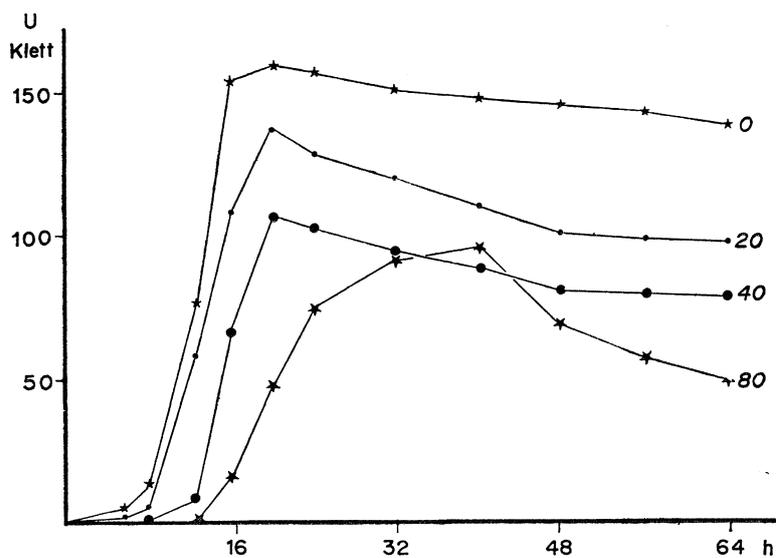


Figura 1. Crecimiento del organismo de la colonia blanca en el medio con extracto de levadura, con varias concentraciones del pentaclorofenato sódico (mg/l)

7. El efecto del pentaclorofenato parece ser debido a la presencia de éste en su forma original, es decir, sin ser degradado, ya que no ha sido asimilado por las bacterias. Usando en 28 cultivos las 18 cepas resistentes a 50 mg/l, no se pudo observar ninguna reducción en la cantidad de este compuesto durante 14 días de cultivo, aunque el crecimiento fue abundante.

DISCUSION

No se conoce el mecanismo por el cual el pentaclorofenol o el pentaclorofenato desaparecen de las aguas naturales y del suelo. Las conclusiones de varios autores no están de acuerdo. Saito y colaboradores (8) obser-

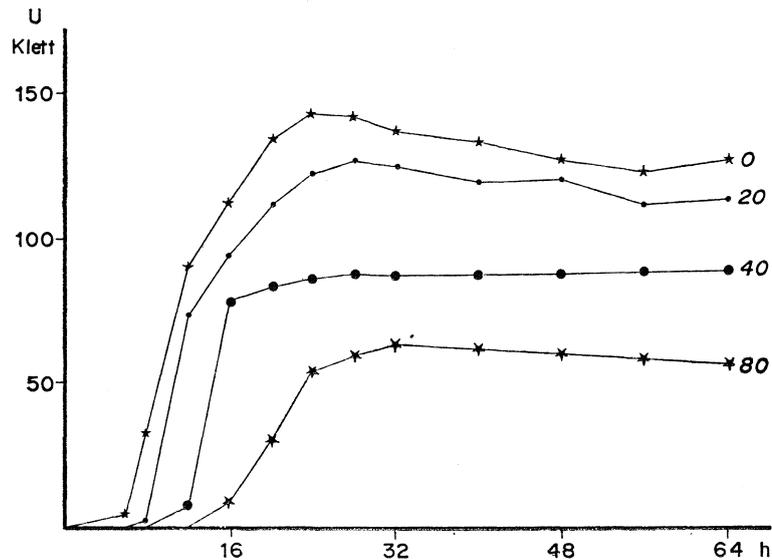


Figura 2. Crecimiento del organismo de la colonia amarilla en el medio con extracto de levadura, con varias concentraciones del pentaclorofenato sódico (mg/l)

varon que el agua de plantaciones de arroz a la cual se había añadido 0,3 kg/acre, contenía sólo 0,5 mg/l al día siguiente. En cambio, Okubo (7) describió extensas incidencias letales de peces en el mar Ariaka, que atribuyó al pentaclorofenol usado en plantas agrícolas situadas en las costas de la isla Kuysha (Japón). El trabajo de Munakata y Kuwahara (6) indica que en el agua y en el suelo estos compuestos son fotodegradados a otras formas de toxicidad comparables a la del pentaclorofenol. Examinando la literatura (1), es evidente que no se le ha dado suficiente importancia al problema que resulta del uso del pentaclorofenol. Es obvia la necesidad de información acerca del efecto de estas sustancias sobre seres vivos en contacto con el agua o el suelo, incluyendo al hombre.

En la primera serie de cultivos se esperaba conseguir microorganismos anaerobios resistentes al pentaclorofenol, puesto que éstos no dependen de la fosforilación oxidante para obtener energía en su mayor grado (14). Los cultivos testigos en este estudio indicaron que los suelos empleados contenían una flora anaerobia normal, y en consecuencia se puede afirmar que ninguno de los microorganismos que constituyen esta flora pue-

den utilizar el pentaclorofenol o su derivado sódico como fuente de carbono. Tampoco se pudo aislar ninguna bacteria anaerobia que pudiese sobrevivir en contacto con pentaclorofenol o su compuesto de sodio en el medio de cultivo empleado.

Los resultados obtenidos en cultivos aerobios, empleando el medio sintético con pentaclorofenol o pentaclorofenato, indican que la flora aerobia de los suelos empleados, aunque especialmente seleccionados, no contiene organismos capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono. Ambos resultados indican, además, que el pentaclorofenol o el pentaclorofenato inactivan la flora del suelo en concentraciones de 8 y 50 mg/l, respectivamente. En este caso, si se quiere especular sobre que los microorganismos del suelo consumen o destruyen estos compuestos, se tendría que decir que esto sólo sucede si las cantidades son menores de las que hemos empleado. Los experimentos que indicaron que las 2 especies de bacterias resistentes al pentaclorofenato no consumían ni modificaban este compuesto nos conducen a la misma conclusión. Otros mecanismos por medio de los cuales estos compuestos podrían ser eliminados tendrían que basarse en transformaciones fisicoquímicas.

Interesante fue el haber aislado 2 especies diferentes de bacterias resistentes a concentraciones del compuesto, que son tóxicas para el resto de la flora microbiana en los suelos examinados. Una o ambas especies de bacterias fueron aisladas de suelos de diferentes localidades.

AGRADECIMIENTO

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Dr. Joe A. Bass por la ayuda prestada durante la preparación del manuscrito.

Este trabajo ha sido financiado en parte con fondos proporcionados por W. J. Smith Wood Preserving Co. Denison, Texas, USA, con una beca del National Defense Educational Act, H.E.W., USA, y con el Faculty Research Fund, North Texas State University.

RESUMEN

La flora microbiana de suelos fértiles es incapaz de utilizar el pentaclorofenol o el pentaclorofenato sódico como fuente de carbono. El pentaclorofenol inhibe completamente el crecimiento de las especies microbianas de estos suelos en caldo nutritivo o en medio suplementado con extrac-

to de levadura. De las poblaciones microbianas telúricas examinadas sólo se aislaron 2 especies de bacterias resistentes al pentaclorofenato sódico. Sin embargo, no se pudo demostrar que éstas degradasen esta sustancia. Se concluye que la población microbiana del suelo estudiada no desempeña un papel primordial en la degradación del pentaclorofenol o del pentaclorofenato sódico.

SUMMARY

Effect of pentachlorophenol on the microbial flora of selected soils

The microbial flora of fertile soils is incapable of utilizing pentachlorophenol (PCP) or its sodium derivative (Na-PCP) as a sole source of carbon. When these substances were added to nutrient broth or soil cultures with yeast extract, the growth of soil bacteria, fungi, actinomycetes, etc. was completely inhibited by the concentrations used. Two cultures of bacteria were isolated which were capable of growing in the presence of PCP and Na-PCP but they did not degrade these compounds.

From the data presented, it appears that the soil microflora do not play an important role in the degradation of PCP or Na-PCP.

BIBLIOGRAFIA

1. BEVENUE, A., y BECKMAN, H. 1967. Pentachlorophenol: A discussion of its properties and its occurrence as a residue in human and animal tissues. *Residue Rev.*, 19, 83.
2. BREED, R. S.; MURRAY, E. D. G., y SMITH, N. R. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7.^a ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
3. FUJITA, M.; ISHIKAWA, S., y YAMASHITA, S. 1967. Effect of calcium ions and pentachlorophenol on the respiration of membrane fragments of *Micrococcus lysodeikticus*. *Nature*, 231, 616.
4. HASKINS, W. T. 1951. Colorimetric determinations of microgram quantities of sodium and copper pentachlorophenate. *Analyt. Chem.*, 23, 1.672.
5. HICOCK, H. W., y OLSON, A. R. 1956. Highway post survey. *Conn. Agr. Expt. Sta. Circ.*, 196, 1.
6. MUNAKATA, K., y KUWAHARA, M. 1969. Photochemical degradation products of pentachlorophenol. *Residue Rev.*, 25, 13.
7. OKUBO, K., y OKUBO, T. 1965. Influence of diluted sea water on the physiological activity of baby-neck clam, *Venerupis japonica*, and the toxic effect of an herbicide PCP, pentachlorophenate. *Bull. Tokai Reg. Fish Res. Lab.*, 44, 31.

8. SAITO, M.; KITAYAMA, M., y KITSUTAKA, T. 1968. Studies on the prevention of poisoning by agricultural chemicals: 12: Influence of herbicide (sodium pentachlorophenol) spread on paddy-field regions upon river water. (Engl. sum.) Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 17, 103.
9. SKERMAN, V. B. D. 1967. A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria. 2.^a ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
10. THIENES, C. H., y HALEY, T. J. 1964. Clinical Toxicology. Lea and Febiger, Philadelphia.
11. VELA, G. R. 1969. The effects of radiation on nitrification in the soil. Texas J. Sci., 20, 314.
12. VELA, G. R., y WYSS, O. 1965. Radiation resistance of soil *Azotobacter*. J. Bacteriol., 89, 1.280.
13. VINIEGRA, G.; MÁRQUEZ, E. M.; MÁRQUEZ, R. E., y SARABOSO, R. S. 1963. Intoxicación con pentaclorofenol en Oso y Piaxtla, Sinaloa (México). Salud Públ. Mex., 5, 915.
14. WEINBACH, E. C. 1957. Biochemical basis for the toxicity of pentachlorophenol. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S., 43, 393.

ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN (C S I C). GRANADA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

INOCULACION CONJUNTA
DE MICROORGANISMOS MOVILIZADORES
DE FOSFORO Y *RHIZOBIUM* EN CULTIVOS
ENARENADOS DE JUDIA

I. Efectos sobre la parte aérea de las plantas en experiencia
hasta floración

por

R. AZCON, J. M. BAREA y V. CALLAO (†)

INTRODUCCION

El empleo de microorganismos del suelo como fertilizantes de plantas cultivadas es una práctica muy extendida en diversos países, sobre todo del Este de Europa. Fundamentalmente, destaca la inoculación de suelos o semillas con microorganismos movilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno atmosférico.

En la búsqueda de una posible aplicación en España de los fertilizantes microbianos, se realizan en nuestro Departamento de Microbiología una serie de trabajos científicos en esta línea de investigación, entre los cuales, el presente se refiere a la inoculación conjunta de 2 microorganismos movilizadores de fósforo y otro fijador simbiótico de nitrógeno, *Rhizobium* concretamente. Las experiencias se realizaron con un peculiar tipo de cultivo de judía: "cultivos enarenados de hortalizas extratempranas". Dicho sistema de cultivo ha sido descrito en diversos trabajos, como el de Rueda y Rueda (11).

Podría ser citada una extensísima bibliografía sobre la fisiología y actividad biológica de los microorganismos del suelo que participan en el ciclo del elemento mineral fósforo y sobre la fijación de nitrógeno por *Rhizo-*

bium en simbiosis con las leguminosas, así como sobre el empleo de los citados microorganismos fertilizantes. Dichos estudios han sido recientemente revisados por Azcón (1), que los relaciona con el sistema de “enarenados” (cultivos arena-materia orgánica).

Aunque el éxito de una fertilización con microorganismos seleccionados con criterios científicos debe ser estudiado en el rendimiento de las cosechas (frutos), en trabajos de invernadero se considera que el análisis de las plantas al iniciarse el período fisiológico de floración puede ser índice de un efecto beneficioso para el vegetal. Ello permitiría determinar más rápidamente la calidad de las razas microbianas inoculadas. Muchos autores han estudiado los efectos de la fertilización microbiana sobre el crecimiento vegetal, antes de que la planta alcance el estado de fructificación. Concretamente, Menkina (6) cita que las fosfobacterias favorecen el crecimiento vegetativo de las plantas. Igualmente, como resultado de la inoculación con *Rhizobium*, ha sido descrito el aumento en el contenido de nitrógeno de la parte aérea y peso seco (8 y 10) o materia verde cosechada (12).

En un posterior trabajo se describirán los efectos de la inoculación de estos microorganismos sobre la producción de frutos por plantas de judía cultivadas por el sistema de “enarenado”; sin embargo, en el presente se estudian los efectos de fertilización biológica sobre la planta al iniciarse el período fisiológico de floración, así como la influencia que pueda tener la aplicación de fertilizantes químicos (N, P, K) sobre la acción de los microorganismos.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Se utilizaron razas microbianas “locales”, es decir, aisladas en rizosferas de los propios cultivos enarenados. Estas razas fueron estudiadas y seleccionadas por experiencias *in vitro* e invernadero (inoculando individualmente cada raza), según se describe en un trabajo previo (2). De acuerdo con dicho trabajo se utilizan en el presente los siguientes microorganismos:

raza de *Rhizobium* 1.36, a la que se le asigna en estas experiencias la sigla “R”;

razas de movilizadores de fósforo: P₂₇, *Agrobacterium* sp., y P₃₀, *Asper-*

gillus niger. En estas experiencias se les asignan las siglas "P" y "H", respectivamente.

El cultivo de estos microorganismos y la preparación de inóculos se realizó tal como se describió anteriormente (2).

Preparación de macetas

Se utilizaron macetas de 2 l de capacidad, aproximadamente, con la siguiente disposición de capas:

Suelo + vermiculita (a partes iguales, en volumen), 700 g

Estiércol (100 g) + suelo (300 g)

Vermiculita (unos gramos para proteger a las semillas del contacto directo con el estiércol)

10 semillas germinadas (dejando posteriormente 4 plantas)

Arena, 100 g

Agua, 650 ml

El agua se adicionó de acuerdo con el cálculo previo de la humedad equivalente de cada una de las capas. Las macetas tenían drenaje abierto, por lo cual se colocó un disco de papel de filtro en el fondo para evitar la caída de materiales. Se realizó el riego diario controlando por pesada, a fin de evitar el drenaje y la pérdida consiguiente de nutrientes.

Los tratamientos ensayados, de acuerdo con las siglas asignadas a los inóculos microbianos, fueron los siguientes: T (testigo), R, P, H, RP, PH y RPH. De cada uno de estos 8 tratamientos se prepararon 6 macetas. A 3 de ellas (en cada tratamiento) se les adicionó, a los 2 días de emerger la plántula, 10 ml de una solución acuosa de abono inorgánico, que contenía los siguientes nutrientes: N₂, 0,48 g/l; P₂O₅, 0,56 g/l; K₂O, 1,22 g/l; oligoelementos, 0,06 g/l (se trata, pues, de un abonado 12 : 14 : 28). Este abonado inorgánico (I) se repitió a los 10 días de experiencia (otros 10 ml de la misma solución/maceta). De esta forma quedaron 3 repeticiones con los tratamientos antes expuestos y otras 3 con las siglas siguientes: T + I, R + I, P + I, H + I, RP + I, RH + I, PH + I v RPH + I.

Las plantas se cultivaron en invernadero, acondicionado de acuerdo con las características de la zona subtropical española donde se cultiva por el sistema de "enarenado" (2 y 11). A los 50 días de cultivo, fecha en que se inició la floración en el tratamiento RP + I, se determinó el

peso seco de la parte aérea de las plantas y el contenido en N y P en dicha parte. Se siguieron los métodos analíticos de la Estación Experimental del Zaidín.

RESULTADOS

Los resultados se muestran en los *cuadros 1-2*. Las siglas empleadas para exponer los distintos tratamientos son las citadas en el capítulo anterior.

Cada resultado es la media de 3 valores, exponiéndose también la significación estadística de los resultados más interesantes.

Cuadro 1. Efectos de la inoculación microbiana sobre el peso seco y contenido en N y P de las plantas

Tratamiento	Peso seco (*) g	Nitrógeno (**) %	Fósforo (**) %
T	7,04 ± 0,28	2,47 ± 0,18	0,24 ± 0,02
R	7,15 ± 0,27	2,49 ± 0,19	0,24 ± 0,03
P	7,35 ± 0,30	2,41 ± 0,17	0,26 ± 0,02
H	8,45 ± 0,30	2,44 ± 0,18	0,24 ± 0,02
RP	7,73 ± 0,20	2,70 ± 0,19	0,23 ± 0,02
RH	7,71 ± 0,28	2,62 ± 0,18	0,24 ± 0,03
PH	7,63 ± 0,29	2,48 ± 0,18	0,24 ± 0,02
RPH	7,78 ± 0,30	2,70 ± 0,21	0,23 ± 0,02
T + I	7,59 ± 0,27	2,45 ± 0,17	0,24 ± 0,03
R + I	7,99 ± 0,29	2,47 ± 0,17	0,24 ± 0,01
P + I	7,35 ± 0,30	2,40 ± 0,17	0,24 ± 0,02
H + I	8,21 ± 0,31	2,44 ± 0,18	0,25 ± 0,03
RP + I	8,53 ± 0,32	2,52 ± 0,19	0,25 ± 0,03
RH + I	8,20 ± 0,29	2,53 ± 0,19	0,24 ± 0,03
PH + I	8,35 ± 0,32	2,53 ± 0,18	0,24 ± 0,03
RPH + I	8,36 ± 0,33	2,59 ± 0,19	0,24 ± 0,03

(*) Materia seca correspondiente a la parte aérea de las plantas. (**) Datos de análisis foliar.

Las diferencias entre cualquiera de los tratamientos H, H + I, RP + I, RH + I y RPH + I y el testigo son significativas, en cuanto a peso seco al 1 %.

Cuadro 2. Efectos de la inoculación microbiana sobre la absorción total de N y P por las plantas

Tratamiento	N total (*) mg	P total (*) mg
T	174,2 ± 8,3	16,9 ± 0,8
R	198,1 ± 8,5	18,2 ± 0,7
P	180,0 ± 8,4	19,3 ± 0,9
H	206,3 ± 9,1	20,3 ± 0,9
RP	208,8 ± 9,3	18,0 ± 0,7
RH	195,5 ± 8,6	18,8 ± 0,8
PH	189,5 ± 8,3	18,6 ± 0,8
RPH	210,1 ± 9,4	18,1 ± 0,7
T + I	185,9 ± 8,6	18,6 ± 0,7
R + I	178,2 ± 8,7	17,9 ± 0,7
P + I	197,8 ± 8,9	19,0 ± 0,9
H + I	200,8 ± 8,9	20,8 ± 0,9
RP + I	215,5 ± 9,4	21,5 ± 0,9
RH + I	207,9 ± 9,1	20,7 ± 0,9
PH + I	211,7 ± 9,4	20,3 ± 0,9
RPH + I	217,1 ± 9,5	20,2 ± 0,9

(*) Total de elemento absorbido por las plantas crecidas en cada maceta (parte aérea).

Significación con respecto a T. N total: P, T + I y R + I, no significativo; R, RH, P + I y RH, 5 %; restantes, 1 %. P total: P, H, PH + I y RPH + I, 5 %; H + I y RH + I, 1 %; RP + I, 0,1 %.

Significación con respecto a T + I. N total: RP + I y RPH + I, 5 %. P total: RP + I, 1 %.

DISCUSION

En el cuadro 1 se observa cómo en esta experiencia, con desarrollo vegetal prolongado hasta un período avanzado (floración), los porcentajes de fósforo y nitrógeno se equilibran considerablemente en los distintos

tratamientos. Por ello, para destacar un tratamiento hay que recurrir al peso seco de cosecha obtenida (quizá reflejo de un mecanismo de producción microbiana de fitohormonas) y más fundamentalmente, al total de nitrógeno o fósforo absorbido por las plantas (*cuadro 2*).

En general, se aprecia que el abonado inorgánico inicial favorece la absorción de nitrógeno y fósforo (*cuadro 2*) por las plantas (lógico); sin embargo, también parece estimular la acción de los microorganismos inoculados. Esto puede comprobarse si se comparan los tratamientos con abonado inorgánico en relación con su testigo (tratamiento T + I).

Sin embargo, existe una excepción importante a este respecto: la adición de abono inorgánico a las plantas inoculadas con *Rhizobium* disminuye la fijación de nitrógeno. Cuando el *Rhizobium* se inocula junto a otro microorganismo, no se aprecia tal descenso en la fijación de nitrógeno. La razón de esta circunstancia se puede buscar en la opinión expresada por diversos autores (7, 9 y 13-14), según los cuales el nitrógeno combinado perjudica la acción del *Rhizobium* por varios mecanismos. El hecho de que inoculando *Rhizobium* con otro microorganismo no sea afectado por la adición de abono inorgánico, puede deberse a que el inóculo acompañante utiliza el nitrógeno combinado y el *Rhizobium* realiza normalmente su actividad biológica.

En cuanto a los efectos de la inoculación conjunta, merece destacarse la interesante asociación de *Rhizobium* con el movilizador de fósforo, raza P₂₇ (tratamiento R + P). La acción del movilizador de fósforo P₃₀ (H) parece también favorecer. Una vez más, se puede hablar de los beneficiosos efectos de las interacciones entre microorganismos fijadores de nitrógeno y movilizadores de fósforo. Sin entrar en aspectos relacionados con los equilibrios de nutrientes dentro de la planta, sí que se puede hablar de una potencialización de efectos, en virtud de la interacción fósforo-nitrógeno, a nivel de disponibilidad de elemento en el suelo, cosa en la que puede intervenir la actividad microbiana, ya que, de acuerdo con Cope y Hunter (3), la movilización de fósforo en los suelos puede favorecer la disponibilidad de nitrógeno en varios aspectos:

- 1) El fósforo favorece la mineralización de nitrógeno orgánico. Cope y Hunter atribuyen esta acción a la estimulación de los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica.

- 2) El fósforo, que puede provenir de la movilización microbiana,

estimula a las bacterias nitrificantes y favorece el desarrollo y función de los *Rhizobium*. Así opinan varios autores (4-5).

3) El fósforo liberado da lugar a la formación de fosfato amónico, por lo que se evitan pérdidas de nitrógeno.

De igual forma, los mismos Cope y Hunter (3) apuntan que el nitrógeno soluble (que puede provenir de la fijación microbiana) favorece la movilización de fósforo en los suelos. Por otra parte, una planta bien nutrida en nitrógeno, caso muy lógico en la inoculación del *Rhizobium*, incrementa su capacidad para captar fósforo, ya aumentando la superficie de la raíz, ya mejorando la absorción.

RESUMEN

Se estudian, por experiencia en invernadero, los efectos de la inoculación de dos razas de microorganismos movilizadores de fosfatos y una raza de *Rhizobium* sobre el crecimiento de plantas de judía cultivadas por el sistema de "enarenado". Los microorganismos fueron seleccionados por su gran actividad fertilizante en un trabajo realizado anteriormente. También se estudia la acción de los fertilizantes minerales sobre la actividad microbiana.

A los 50 días de crecimiento se determinó la materia seca de la parte aérea de las plantas y se analizó el contenido en N y P. Aunque se obtuvieron, en general, buenos resultados en la aplicación conjunta de los fertilizantes minerales y microbianos, el nitrógeno combinado afectaba negativamente a la actividad del *Rhizobium* (como inóculo). El mejor tratamiento fue la aplicación simultánea de *Rhizobium* y el movilizador de fósforo *Agrobacterium* sp (raza P₂₇) y fertilizantes minerales (N, P, K).

SUMMARY

Inoculation of mobilizing-phosphates microorganisms and Rhizobium in sand-organic matter cultures ("enarenados") of Phaseolus vulgaris.

I. Effects on shoots at flowering

The effects of the inoculation of 2 mobilizing-phosphates microorganisms and 1 *Rhizobium* sp. on french bean cultivated in sand organic

matter cultures was studied in pot experiments. The microbial strains were previously selected among several others. The action of mineral fertilizers on microbial activity was also tested.

After 50 days growing in greenhouse, the aerial part of the plants was analysed for N and P and the dry matter harvested.

Good results were obtained when microbial fertilizers were applied together with mineral ones, but combined nitrogen decreased rizobial activity when this bacterium was inoculated alone.

The best treatment was the simultaneous application of *Rhizobium*, and *Agrobacterium* sp (a phosphate movilizers) and mineral fertilizers.

BIBLIOGRAFIA

1. AZCON, R. 1972. Efectos de la inoculación de microorganismos movilizados de fósforo y fijadores de nitrógeno sobre cultivos enarenados de judía y tomate. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Facultad de Farmacia.
2. AZCON, R.; BAREA, J. M., y CALLAO, V. 1973. Selección de microorganismos movilizados de fósforo y fijadores de nitrógeno para su empleo como fertilizantes biológicos en cultivos enarenados. Cuadernos de Ciencias Biológicas, III, 23.
3. COPE, F., and HUNTER, J. G. 1967. Interactions between nitrogen and phosphate in agriculture. Phosphorus in Agriculture. Bull. Doc. Ass. Int. Fabr. Superphosphate, 46.
4. DE MOOY, C. S., and PESEK, J. 1966. Nodulation response of soybeans to added phosphorus, potassium and calcium salts. J. Agron., 58, 275.
5. KHARE, N. K., and RAI, M. M. 1968. Effect of phosphorus on symbiotic fixation of nitrogen by leguminous crops. J. Indian Soc. Soil Sci., 16, 111.
6. MENKINA, R. A. 1963. Bacterial fertilizers and their importance for agricultural plants. Mikrobiologiya, 33, 352.
7. MISHUSTIN, E. N., and SHILNIKOVA, V. K. 1971. Biological Fixation of Atmospheric Nitrogen. McMillan Press Lim., London.
8. ORLOVA, Z. A. 1969. Effect of treatment with nitragin on the quantitative accumulation of biological nitrogen by annual leguminous crop in the Stravropol region. Tr. Stravropol. Sel'skokhoz Inst., 6, 132.
9. RAGGIO, M.; RAGGIO, N., and TORREY, J. G. 1965. The interaction of nitrate and carbohydrates in rizobial root-nodule formation. Plant Physiol., 40, 601.
10. ROTAR, P. P.; URATA, V., and BROMDEP, A. 1967. Effectiveness of nodulation on growth and nitrogen content of legumes on several Hawaiian soils with and without the use of proper *Rhizobium* strain. Hawaii Agr. Exp. Sta. Tech. Progr. Rep., 158, 11.

11. RUEDA, E., y RUEDA, J. M. 1965. Cultivos Enarenados de Hortalizas Extratempranas. Editorial Mundiprensa, Madrid.
12. STADNICHUUK, P. F.; SEKRETEVA, L. F., and TIMURDZHI, G. K. 1969. Inoculation of soya seeds with nitragin in mixed stand with maize. Mikrobiologiya, 38, 497.
13. TANNER, J. W., and ANDERSON, S. C. 1963. An external effect of inorganic nitrogen in root nodulation. Nature, 198, 303.
14. VIRTANEN, A. I. 1953. Microbiology and chemistry of symbiotic nitrogen fixation. Proc. Int. Bot. Congr. 7th, 156.

AISLAMIENTO DE UN *VIBRIO* HALOFILO A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES DE ZONAS ALEJADAS DEL MAR

por

J. M. ARCOS, A. DEL MORAL y J. REPÁRAZ

I. INTRODUCCION

En el momento actual no parece existir una definición universalmente aceptada del género *Vibrio*, quizás debido tanto a la gran heterogeneidad de las especies que en él se incluyen (17) como al desconocimiento de los caracteres taxonómicos que hagan posible tal definición.

Pese a la publicación de trabajos más recientes que se ocupan de este problema (1, 3 y 5-7) la OMS adopta, por el momento (31), los criterios emanados del Subcomité Internacional de Taxonomía de los *Vibrio* (13), modificados en el año 1967 (32).

Ahora bien, dentro ya de lo que según estas normas se entiende por género *Vibrio*, se admiten, como es lógico, diferentes especies, las cuales, sin embargo, se reducen en la práctica a dos fundamentales en lo que se refiere a enteropatogenicidad humana. La especie *Vibrio cholerae* incluye además del vibrión colérico clásico, el biotipo El Tor y el abigarrado grupo de los denominados vibriones no aglutinables (NAG), no coléricos (NCV) y vibriones del agua (9). Por su parte, la especie *V. parahaemolyticus*, aislada por vez primera en el Japón (15), está siendo detectada y estudiada en numerosos países y circunstancias (2, 14, 21, 23, 26-27, 29,

33 y 36-40), quedando fuera de duda su papel etiopatogénico en brotes de toxiinfección alimentaria (4, 10 y 22). Dentro de esta especie quedan comprendidos otros *Vibrio* de clasificación aún no precisa, cuya significación epidemiológica está por decidir. Se trata de *V. alginolyticus* de Sakazaki (28) y otros afines al *V. anguillarum* (30).

Se acepta que las diferencias entre *Vibrio cholerae* y El Tor no son esenciales, así como tampoco las existentes entre ambos *Vibrio* y los NAG, salvo en la falta de aglutinación de éstos frente al antisuero 0 grupo I. Esta ausencia de poder aglutinante es compartida por todo el grupo de *V. parahaemolyticus*, pero éste, a su vez, se diferencia de los NAG fundamentalmente en su mayor tolerancia al CINa, posiblemente en correspondencia con su habitat normal, marino o estrechamente relacionado con el mar.

El presente trabajo pretende señalar la existencia de un representante del género *Vibrio* en aguas residuales de zonas no marinas, cuya posición taxonómica podría ser intermedia entre los grupos arriba citados y cuya proximidad al hombre puede hacer que se le considere en directa conexión con éste.

II. MATERIAL Y METODOS

Se hicieron tomas de aguas residuales de diferentes zonas de Navarra, en frascos estériles. 6-8 h después, como máximo, se pasaron 900 ml a matraces con 100 ml de agua de peptona alcalinã (APA), a pH 8,6, a concentración 10 veces superior a la normal y se incubó a 37 °C, durante 16-18 h. A partir de este primer caldo se pasó 1 ml sobre 9 ml de APA, ya a concentración normal, incubando solamente 6 h y finalmente, a partir de éste, se inoculó por agotamiento una placa de agar nutritivo alcalino (ANA), con 3 % de CINa, a pH 7,6. Las colonias bien aisladas y que eran positivas a la prueba de la oxidasa, según Kovacs (20), fueron elegidas cuidadosamente como objeto exclusivo de posteriores pruebas.

Estas se realizaron según técnicas que se describen a continuación, empleando en general medios deshidratados del comercio (Difco, BBL, Oxoid, etc.). Las incubaciones, salvo cuando expresamente se indica otra cosa, fueron siempre a 37 °C durante 18-24 h.

Morfología, Gram y movilidad. Las preparaciones se hicieron a partir de cultivos jóvenes en agua de peptona con 2 % de sal.

Flagelos. Su disposición fue observada habitualmente por tinción (25) y en algunos casos por microscopía electrónica.

Utilización de la glucosa. Se usó el medio de Hugh y Leifson (16).

Pigmentación y fluorescencia. Medios A y B de King (18), agar nutritivo, etc.

Tolerancia a la sal común. Se anotó la aparición de turbidez a las 24 y 48 h de cultivo en agua de peptona con 0, 2, 5, 7 y 10 % de ClNa, y en agua de triptona con 0 y 7,5 % de la misma sal.

Catalasa. Técnica del portaobjetos con H₂O₂ al 3 % (8).

Nitratasa. Sobre caldo de nitrato al 0,1 %, después de 5 días de incubación (8).

Lipasa. Se empleó el agar tween 80 (34).

Ureasa. Producción en medio de Christensen (11).

Gelatinasa. Tubos de gelatina nutritiva con 3 % de ClNa fueron inoculados por picadura e incubados a temperatura ambiente durante 14 días.

Descarboxilasas. Se utilizó el método de Moeller (24), añadiendo al medio base 3 % de ClNa.

Rojo de Metilo y Voges-Proskauer. Los cultivos en caldo-glucosa-fosfato con 3 % de ClNa se mantuvieron 2 días antes de realizar las pruebas de acidificación y producción de acetoina.

Indol. Con reactivo de Kovacs sobre agua de triptona con 7,5 % de sal, después de 1-5 días de incubación. Como confirmación se empleó tira de papel de filtro impregnada en ácido oxálico.

Citrato. Medio de Koser (19).

SH₂. Junto con otras propiedades, se determinó sobre agar-hierro de Kligler (KIA), a las 48 h de incubación como máximo.

Fenilalanina-desaminasa. Sobre crecimiento en tubo inclinado de agar de fenilalanina (8).

Malonato. Crecimiento en caldo-malonato (Difco).

Utilización de glúcidos. Todos ellos fueron probados al 1 % (p/v) en medio líquido con azul de bromotimol como indicador. Excepciones fueron: glucosa, que se ensayó en medio de Hugh y Leifson y en KIA (que sirvió simultáneamente para lactosa) y manitol, para el cual se utilizó, simplemente por razones prácticas del laboratorio, el medio semisólido manitol-movilidad.

Sensibilidad a antibióticos. Se empleó el método de difusión en agar

Cuadro 1. Características de *Vibrio ibericus*

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Bacilo recto	+	10 %	+	Fermentación de glucosa	+
Existencia de formas curvadas	+	Crecimiento en medio de Clark y		Producción de gas a partir de glucosa	—
Tendencia al pleomorfismo	+	Lubs:		Acidez de:	
Gram-negativo	+	sin ClNa	—	adonitol	—
Asporógeno	+	con 3 % de ClNa	+	arabinosa	—
Movilidad	+	Requerimiento de agua de mar	—	celobiosa	(+)
Monotrico polar	+	Crecimiento a pH 8,6	+	dulcitol	—
Aerobio	+	Crecimiento en agar TCBS	+	fructosa	(+)
Anaerobio facultativo	+	Oxidasa	+	inositol	—
Producción de pigmento	—	Catalasa	+	lactosa	—
Producción de fluoresceína	—	Ureasa	—	maltosa	+,—
Invasión de la superficie del agar	+	Nitratasa	+	manitol	+
Crecimiento a:		Rojo de metilo	(—) (*)	manosa	+
4 °C	—	Voges-Proskauer	+	rafinosa	—
14 °C	—	Indol	(+)	ramnosa	—
20 °C	+	Utilización de citrato	+	sacarosa	+
37 °C	+	Gelatinasa	+	salicina	—
41 °C	+	Lipasa	+	sorbitol	—
Crecimiento en agua de peptona:		Lisina-descarboxilasa	+	xilosa	—
sin ClNa	—	Ornitina-descarboxilasa	+	Hidrólisis de esculina	—
con ClNa:		Arginina-dihidrolasa	—	Sensibilidad a:	
0,5 %	+	Fenilalanina-desaminasa	+	penicilina 10 U.	+,—
2 %	+	Sulfuro de hidrógeno en KIA	—	novobiocina 5 γ	—
5 %	+	Utilización de malonato	—	polimixina B 50 U.	—
7 %	+	Acidez de glucosa	+		

(*) Los signos entre paréntesis indican reacción lenta y/o débil.

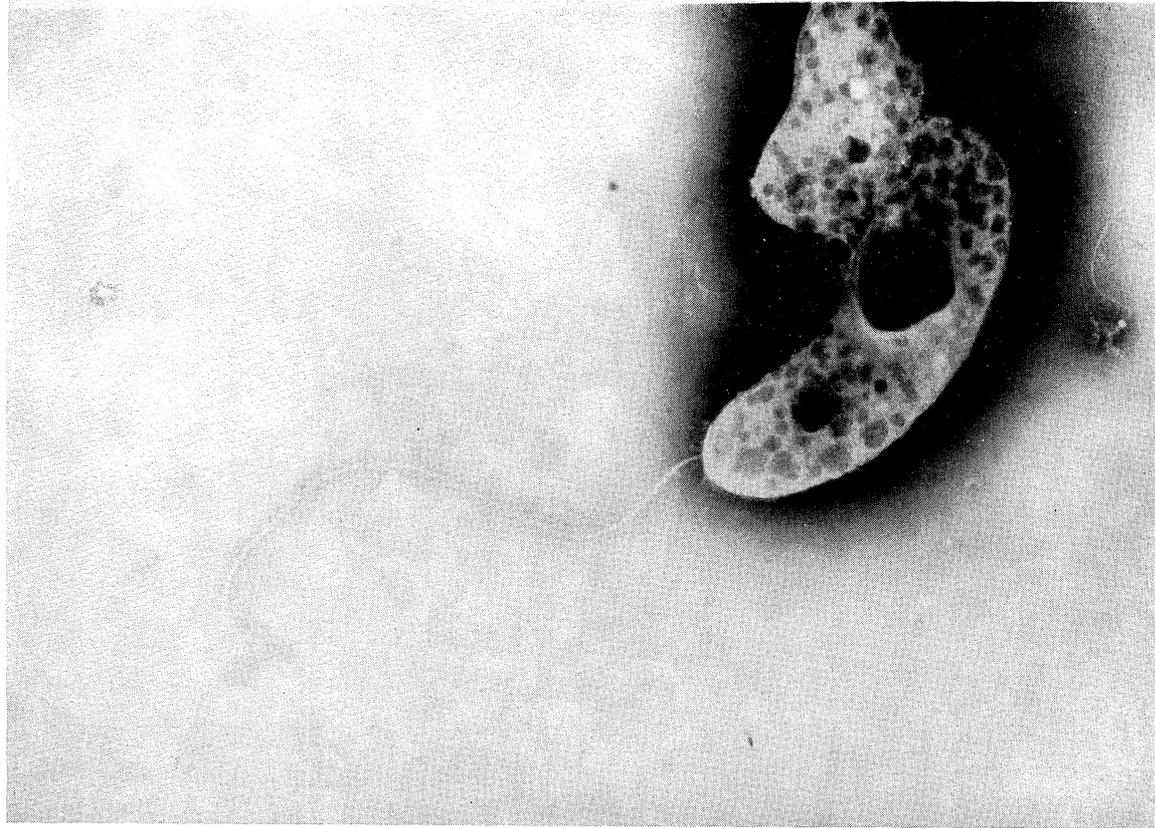


Figura 1. Vibrio ibericus. Micrografía electrónica realizada en el Centro Nacional de Virología y Ecología Sanitarias. × 22.540

en medio de Mueller-Hinton, siguiendo las recomendaciones de Ericsson y Sherris (12).

Aglutinación. A partir del crecimiento en KIA, se utilizó la técnica del portaobjeto con suero anti-O, subgrupo I, polivalente (Difco).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Según el procedimiento analítico que se ha descrito, las aguas residuales objeto del presente estudio mostraron sin excepción prácticamente, un buen desarrollo en cultivo aerobio de 6 h, a 37 °C, en agua de peptona, a pH 8,6; y en agar nutritivo alcalino, a pH 7,6, después de 24 h. Con relativa frecuencia se encontraron en este medio colonias de bacilos gram-negativos y oxidasa-positivos, que por estas razones pasaron a ser estudiados con más detenimiento.

De esta manera se detectaron e identificaron representantes de los géneros *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, etc., y en un alto porcentaje se destacó la presencia de un microorganismo cuyas principales características aparecen resumidas en el *cuadro 1*. Aparte de otras propiedades no estudiadas, y que pudieran ser de interés, es de advertir la ausencia de una que diversos autores (1 y 5) consideran de gran valor taxonómico: la sensibilidad al agente vibriostático 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil pteridina). La dificultad de su adquisición hace imposible de momento su inclusión entre las propiedades del microorganismo estudiado.

Se trata de un bacilo gram-negativo, recto, pero con frecuentes formas incurvadas típicas y tendencia al pleomorfismo, de movilidad centelleante mediante un único flagelo polar (*figura 1*), que ataca la glucosa en y sin presencia de aire, no produciendo gas.

Crece muy abundantemente a 37 °C y no produce ninguna clase de pigmentos o fluorescencia. Forma catalasa, nitrataza, oxidasa, gelatinasa, descarboxilasas de lisina y ornitina y es negativa para ureasa y arginina-dihidrolasa. Utiliza y da ácido a partir de manitol, pero no de inositol. La producción de indol a partir de triptófano es positiva, lenta y a veces, además, débil. El conjunto de todas estas características permite encuadrar el microorganismo problema en el género *Vibrio* (31), diferenciándolo suficientemente de los otros géneros ya citados de bacilos gram-negativos oxidasa-positivos.

Más complejo resulta distinguir dentro del género *Vibrio* entre las di-

ferentes especies admitidas como tales. Reduciendo el amplio campo a nuestros límites prácticos, son dos los grandes grupos de vibriones relacionados con el hombre y de enteropatogenicidad reconocida o al menos en litigio y que, por tanto, pudieran encontrarse con mayor o menor probabilidad en aguas residuales.

En el primero de ellos, grupo del *Vibrio cholerae*, se encuentra una clara diferenciación entre los que poseen antígenos 0-1 y aglutinan, por tanto, con el suero polivalente homólogo y los que no poseen este grupo de antígenos somáticos. El vibrión que hemos estudiado no es capaz de reaccionar con dicho suero ni siquiera después de sometido a 100 °C durante 2 h. Fundamentalmente, esto descarta la posibilidad de que se trate de *V. cholerae* clásico o del biotipo El Tor, junto con algunas otras características que aparecen en el *cuadro 2*.

Cuadro 2. Principales características diferenciadoras entre especies de Vibrio según Colwell y V. ibericus

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahae-</i> <i>molyticus</i>	<i>V. algino-</i> <i>lyticus</i>	<i>V. ibericus</i>
Requerimiento de agua de mar	—	+	—	—
Crecimiento en agua de peptona:				
sin ClNa	(+)*	(—)	+	—
con 7 % de ClNa	±	+	+	+
con 10 % de ClNa	—	+	+	+
Crecimiento a 4°-7 °C	—	—	+	—
Voges-Proskauer	±	(—)	—	+
Fenilalanina-desaminasa	—	—	+	+
Oxidasa	+	+	—	+
Lisina-descarboxilasa	+	+	—	+
Ornitina-descarboxilasa	+	(+)	—	+
Acidez de:				
arabinosa	—	(+)	—	—
manosa	(+)	+	—	+
sacarosa	(+)	(—)	+	+
manitol	+	+	—	+
salicina	—	(—)	+	—
xilosa	—	—	+	—
Hidrólisis de esculina	—	(+)	+	—
Invasión de la superficie del agar	—	—	±	+

(*) Los signos entre paréntesis indican porcentajes inferiores al 100 %.

Menos diferencias se encuentran aún con los vibriones no aglutinables de este mismo grupo. Pero es principalmente su requerimiento de sal (al menos 0,5 % en caldo peptona-dextrosa-fosfato) y la tolerancia de ella (hasta 10 % de ClNa en agua de peptona) lo que no permite su introducción en este abigarrado grupo de vibriones no coléricos, no aglutinables, pero no halófilos, cuya patogenicidad se va reconociendo cada día más.

Es indudable que este requerimiento, moderado, pero estricto, del cloruro sódico relaciona más a este microorganismo no aglutinable con el segundo grupo, cuya especie tipo es *Vibrio parahaemolyticus* y cuya taxonomía dista mucho de ser completa.

Sakazaki (29 y 33) describe la especie *Vibrio parahaemolyticus*, propone la denominación de *V. alginolyticus* para su biotipo 2 (28) y cifra la separación entre éstos y los microorganismos semejantes al *V. anguillarum* (30) en propiedades muy escasas y no de gran relieve (cuadro 3).

En la práctica, la fermentación positiva de sacarosa que presenta el *Vibrio alginolyticus* es la circunstancia de más valor diagnóstico, seguida de la producción de acetoina y la tolerancia del 10 % de ClNa. Este es el criterio que mantiene la OMS (31) y el que comparten la mayoría de los otros autores (35-37 y 39). No obstante, Colwell, muy recientemente (7), ha realizado un estudio en el que se comprobaron 200 características sobre 86 cultivos de vibriones y especies afines. Esta autora, sorprendentemente, describe el *V. alginolyticus* como una especie que no presenta demasiada relación con *V. parahaemolyticus* ni con lo que se ha venido aceptando como *V. alginolyticus* y ni siquiera con lo que se acepta como definición del género *Vibrio* (cuadro 2). La ausencia de oxidasa y de lisina Descarboxilasa, por ejemplo, así como la no fermentación de manitol, son criterios difícilmente superables para seguir denominando *V. alginolyticus* a tales microorganismos, al menos a la luz de lo más universalmente aceptado hasta el momento, y desde luego de lo que describe el propio Sakazaki (28).

De acuerdo con todo lo expuesto, la bacteria aislada de aguas residuales se asemeja extraordinariamente al *Vibrio alginolyticus* de Sakazaki, excepto en la producción de fenilalanina-desaminasa, reacción más débil y tardía para indol y citrato, mientras el rojo de metilo se hace negativo sólo después de 4 días de incubación a 37 °C (cuadro 2).

Se diferencia del *Vibrio parahaemolyticus* del mismo autor, principalmente porque acidifica sacarosa, crece bien en 10 % de ClNa, produce

acetoína e invade la superficie de placas de agar nutritivo alcalino con 3 % de ClNa (cuadro 3).

Cuadro 3. Principales características diferenciadoras entre especies halófilas de *Vibrio*, según Sakazaki y *V. ibericus*

	<i>V. parahae-molyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. alginoliticus</i>	<i>V. ibericus</i>
Crecimiento en agua de peptona con 7 % de ClNa	+	—	+	+
Crecimiento en agua de peptona con 10 % de ClNa	—	—	+	+
Producción de indol	+	+	+	+
Rojo de metilo	+	+	—	—
Voges-Proskauer	—	—	+	+
Acidez de arabinosa	(+)(**)	—	(—)	—
Acidez de sacarosa	—	(—)	+	+
Fenilalanina-desaminasa	—	—	—	+
Invasión de la superficie del agar	—	—	+	+

(*) Tanto el resultado positivo para la prueba de indol como el negativo para rojo de metilo, fueron obtenidos con garantía absoluta, sólo después de 3-4 días de incubación.

(**) Los signos entre paréntesis indican porcentajes inferiores al 100 %.

Para admitir sin restricción alguna la identidad entre *Vibrio alginolyticus* y este bacilo aislado de aguas residuales, resta, sin embargo, explicar la presencia de este vibrión halófilo en zonas interiores, a 200 km de la costa marítima más cercana.

La frecuencia de aparición y su amplia distribución en el tiempo y en el espacio no permiten pensar en el caso, siempre posible y prácticamente inexplicable, de una contaminación accidental. Más bien habrá que admitir su adaptación a ambientes que, teóricamente y según nuestros conocimientos actuales, no le corresponden.

En tanto no quede suficientemente aclarada su identidad y con el exclusivo fin de facilitar la expresión lingüística proponemos llamar *Vibrio ibericus* a este microorganismo objeto de nuestro estudio, y así aparece citado en los cuadros y figura adjuntos. Esta denominación simplemente

geográfica y provisional no presupone en ningún momento la creencia del hallazgo de una nueva especie del género *Vibrio*. En el momento actual se prosigue el estudio del llamado *V. ibericus* con el fin de conocer con la mayor precisión posible su distribución e identidad.

RESUMEN

Se señala la presencia de un *Vibrio* halófilo en diferentes aguas residuales, cuya posición taxonómica es muy próxima al biotipo 2 de *Vibrio parahaemolyticus*, equivalente al *V. alginolyticus* propuesto por Sakazaki. El habitat de esta bacteria halófila resulta totalmente insólito, según lo descrito hasta el momento para *V. alginolyticus*, y algunas pocas características bioquímicas también son diferentes. Se propone provisionalmente el nombre de *V. ibericus*, basado exclusivamente en razones geográficas y de comodidad, en tanto no se consiga conocer la identidad exacta de este *Vibrio*.

SUMMARY

Isolation of an halophilic Vibrio from sewage waters proceeding of far-away sea areas

The presence of an halophilic *Vibrio* in different sewage waters is shown. Its taxonomic position is very near to biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus* (*V. alginolyticus* after Sakazaki). Only the habitat of this halophilic bacteria is quite unusual as far it is known, and very few biochemical characteristics are different also. The provisional denomination of *V. ibericus* is proposed by both geographical and convenience reasons, until the complete identification of this *Vibrio* has been achieved.

BIBLIOGRAFIA

1. BAIN, N., and SHEWAN, J. M. 1968. Identificación of *Aeromonas*, *Vibrio* and related organisms. En B. M. GIBBS and D. A. SHAPTON (ed.). Identification methods for microbiologists. Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser., 2, 79.
2. BAROSS, J., and LESTON, J. 1968. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific. Nature, 217, 1263.

3. BASDEN, E. H.; TOURTELOTTE, M. E.; PLASTRIDGE, W. N., and TUCKER, J. S. 1968. Genetic relation-ship among bacteria clasified as *Vibrio*. *J. Bacteriol.*, 95, 439.
4. BATTEY, Y. M.; WALLACE, R. B.; ALLAN, B. C., and KEEFFE, B. M. 1970. Gastroenteritis in Australia caused by a marine *Vibrio*. *Med. J. Aust.*, 1, 430.
5. CARPENTER, K. P.; HART, J. M.; HATFIELD, J., and WICKS, G. 1968. Identification of human vibrios and allied organisms. En B. M. GIBBS and D. A. SHAPTON (ed.). *Identification methods for microbiologists*. Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser., 2, 9.
6. CITARELLA, R. V., and COLWELL, R. R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: Polynucleotide sequence relationships among selected *Vibrio* species. *J. Bacteriol.*, 104, 434.
7. COLWELL, R. R. 1970. Polyphasic taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.*, 104, 410.
8. COWAN, S. T., and STEEL, K. J. 1966. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, London.
9. CHATTERJEE, B. D.; GORBACH, S. L., and NEOGY, K. N. 1970. Characteristics of non-cholera vibrios isolated from patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, 3, 677.
10. CHATTERJEE, B. D.; NEOGY, K. N., and GORBACH, S. L. 1970. Study of *Vibrio parahaemolyticus* from cases of diarrhoea in Calcuta. *Indian J. Med. Res.*, 58, 234.
11. CHRISTENSEN, W. B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.*, 52, 461.
12. ERICSSON, H. M., and SHERRIS, J. C. 1971. *Antibiotic Sensitivity Testing. Report of an international collaborative study*. Munkgaard, Copenhagen.
13. FEELEY, J. C. 1966. Minutes of IAMS subcommittee on Taxonomy of vibrios. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 135.
14. FISHBEIN, M.; MEHLMAN, I. J., and PITCHER, J. 1970. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the processed meat of Chesapeake Bay blue crabs. *Appl. Microbiol.*, 20, 176.
15. FUJINO, T.; OKUNO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A.; FUKAI, K.; FUKAI, T., and UEHO, T. 1953. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.*, 4, 299.
16. HUGH, R., and LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66, 24.
17. JONES, D., and SNEATH, P. H. A. 1970. Genetic transfer and bacterial taxonomy. *Bacteriol. Rev.*, 34, 40.
18. KING, E. O.; WARD, M. K., and RANEY, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 301.
19. KOSER, S. A. 1923. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J. Bacteriol.*, 8, 493.

20. KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, Lond., 178, 703.
21. KRANTZ, G. E.; COLWELL, R. R., and LOVELACE, E. 1969. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab-*Callinectes sapidus*-in Chesapeake Bay. *Science*, 164, 1286.
22. LECLAIR, R. A.; ZEN-YOKI, H., and SAKAI, S. 1970. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from clinical specimens. *Pub. Health.*, 28, 82.
23. MIYAMOTO, Y.; KATO, T.; OBARA, Y.; AKIYAMA, S.; TAKIZAWA, K., and YAMAI, S. 1969. *In vitro* haemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *J. Bacteriol.*, 100, 1147.
24. MOELLER, V. 1955. Simplified tests for some amino-acid decarboxylases and for the arginine-dihydrolase system. *Acta Pathol. Microbiol Scand.*, 36, 158.
25. RHODES, M. E. 1958. The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 639.
26. RODRÍGUEZ-REBOLLO, M.; TAMURA, K.; HECHELMANN, H., y LEISTNER, L. 1971. Aislamiento del *Vibrio parahaemolyticus* en España. *Microbiol. Españ.*, 24, 171.
27. ROLAND, F. P. 1970. Leg gangrene and endotoxin shock due to *Vibrio parahaemolyticus*, and infection acquired in New England coastal waters. *New Engl. J. Med.*, 282, 1306.
28. SAKAZAKI, R. 1968. Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 21, 359.
29. SAKAZAKI, R. 1968. Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. II. Serological characteristics. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 21, 313.
30. SAKAZAKI, R. 1969. Halophilic *Vibrio* infections. En H. RIEMANN (ed.). *Food-Corne Infections and Intoxications*. Academic Press., New York.
31. SAKAZAKI, R. 1970. Clasificación y características de los vibriones. En *Principios y Prácticas de la Lucha contra el Cólera*. Cuadernos de Salud Pública, OMS, pág. 33.
32. SAKAZAKI, R.; GÓMEZ, C. Z., and SEBALD, M. 1967. Taxonomical studies of the so-called NAG-vibrios. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 20, 265.
33. SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S., and FOKUMI, H. 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 16, 161.
34. SIERRA, G. 1957. A simple method for the detection of the lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23, 15.
35. SMITH, M. R. 1970. Dos nuevas descripciones de bacterias patógenas entéricas. I. *Vibrio parahaemolyticus*. Fifth Regional Seminar Meeting on Tropical Medicine and Public Health. Southeast Asia Ministers of Education Meeting, U.S. Naval Medical Research Unit No. 2., Taipei, Taiwan.

36. THOMSON, W. K., and TRENHOLM, D. A. 1971. The isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic bacteria from Canadian Atlantic shellfish. *Can. J. Microbiol.*, 17, 545.
37. TWEDT, R. M.; SPAULDING, P. L., and HALL, H. E. 1969. Morphological, cultural, biochemical and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolated in the United States. *J. Bacteriol.*, 98, 511.
38. VANDERZANT, C.; NICKELSON, R., and PARKER, J. C. 1970. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from gulf coast Shrimp. *Milk Food Technol.*, 33, 161.
39. WARD, B. Q. 1968. Isolation of organisms related to *Vibrio parahaemolyticus* from American stuarine sediments. *Appl. Microbiol.*, 16, 543.
40. ZEN-YOJI, H.; SAKAI, S.; TERAYAMA, T.; KUDO, Y.; ITO, T.; BENOKI, M., and NAGASAKI, M. 1965. Epidemiology, enteropathogenicity, and classification of *Vibrio parahaemolyticus* *J. Infec. Dis.*, 115, 436.

PROF. VICENTE CALLAO (†)

El 23 de febrero último falleció en Granada, a los 64 años de edad y de forma inesperada, el profesor D. Vicente Callao Fabregat. Nacido en Albocácer, pequeño pueblo de la provincia de Castellón, era catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada desde 1949. En la Universidad de Madrid cursó los estudios de licenciatura y posteriormente de doctorado en Medicina y Farmacia. Médico de la Sanidad Nacional, fue Subjefe y, desde 1971, Jefe Provincial de Sanidad de Granada. Desde la fundación de la Estación Experimental del Zaidín, del CSIC, dirigió la Sección de Microbiología. De su dedicación a la docencia e investigación surgió una auténtica Escuela de Microbiología, entre cuyos discípulos se cuentan hoy varios catedráticos de Universidad y una larga relación de personas dedicadas a la investigación en este campo. Ha sido director de una treintena de tesis doctorales realizadas en el Departamento Interfacultativo de la Universidad y en la Estación Experimental del Zaidín, y autor de más de un centenar de trabajos científicos.

El Prof. Callao era Consejero de número del CSIC y Académico de número de la Real Academia de Medicina de Granada; estaba en posesión de la Encomienda con placa de la Orden Civil de Sanidad y era miembro de numerosas sociedades científicas españolas y extranjeras, entre ellas la Sociedad Española de Microbiología, de cuya última Junta de Gobierno formó parte. Con la muerte del Prof. Callao, la Microbiología española ha perdido una de sus más destacadas figuras. Descanse en paz.

J. OLIVARES

CONFERENCIA SOBRE COLECCIONES DE CULTIVOS

La II Conferencia Internacional sobre Colecciones de Cultivos se celebrará del 15 al 20 del próximo mes de julio, en el Instituto Biológico de São Paulo, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Sao Paulo.

Correspondencia: Secretaría General, ICCC-II, Palacio das Convenções, Parque Anhembi, 02012 São Paulo, SP (Brasil).

BIBLIOGRAFIA

INMUNOLOGIA MEDICA, por J. H. Humphrey y R. G. White. 1972.
2.^a edición. Ediciones Toray, S. A., Barcelona. XII + 797 páginas
y numerosas fotografías y microfotografías.

Este libro es la traducción al castellano de la 3.^a edición de la obra
inglesa "Immunology for Students of Medicine".

La Inmunología ha pasado de ser una rama auxiliar de la Microbio-
logía a constituir una ciencia básica, fundamental en numerosos capítulos
de la Patología. En Medicina abarca campos tan importantes como la
alergia, enfermedades autoinmunitarias, tumores, trasplantes, enfermeda-
des infecciosas, parasitarias, etc.

Esta obra que comentamos es fiel reflejo de su título y abarca las di-
ferentes ramas del mismo. Dividida en 16 capítulos, comienza con un
amplio e interesante desarrollo histórico de la Inmunología.

Si bien toda la obra es extraordinariamente didáctica, cabe destacar el
capítulo IV dedicado a inmunoglobulinas y el capítulo V: El complemen-
to y otros factores auxiliares; así como los dedicados a hipersensibilidad.

La exposición es muy clara y la traducción (del Dr. Capdevila Ar-
mengol) muy buena.

La edición, asimismo, es buena. En resumen, es un libro básico, pues-
to al día, no sólo para estudiantes de Medicina, como indica su edición
inglesa, sino para el médico en general, por lo que nos parece mejor el
título de la versión española.

F. RUIZ FALCÓ

Depósito legal: M. 702 - 1968.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid